

Institut für Genombiologie
des Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie (FBN)

**Molekulare und genetische Analyse des porcinen
Glucocorticoid-Rezeptor-Gens (*NR3C1*)**

Kumulative Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Henry Reyer

Rostock, 04. November 2013

Gutachter: Prof. Dr. Ulrike Gimsa

Institut für Verhaltensphysiologie

Leibniz-Institut für Nutztierbiologie Dummerstorf

Prof. Dr. Klaus Wimmers

Institut für Genombiologie

Leibniz-Institut für Nutztierbiologie Dummerstorf

PD Dr. Thomas Bittorf

Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie

Universität Rostock

Datum der Einreichung: 05. November 2013

Datum der Verteidigung: 25. April 2014

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | III |
| Darstellungsverzeichnis | V |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Literaturüberblick | 2 |
| 1.1.1 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse | 2 |
| 1.1.2 Struktur und Funktion des Glucocorticoid-Rezeptors | 4 |
| 1.1.2.1 Strukturelle Diversität des humanen und porcinen Glucocorticoid-Rezeptors | 4 |
| 1.1.2.2 Funktionsweise des Glucocorticoid-Rezeptors | 7 |
| 1.1.2.3 Physiologische Effekte des Glucocorticoid-Rezeptors | 9 |
| 1.1.2.4 Mutationen des Glucocorticoid-Rezeptors | 11 |
| 1.1.3 Die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse als Merkmal der Stressempfindlichkeit in der Schweinezucht | 13 |
| 1.2 Zielstellung | 15 |
| 2 Veröffentlichungen | 16 |
| 2.2 A Substitution in the Ligand Binding Domain of the Porcine Glucocorticoid Receptor Affects Activity of the Adrenal Gland | 18 |
| 2.3 Association of N-terminal Domain Polymorphisms of the Porcine Glucocorticoid Receptor with Carcass Composition and Meat Quality Traits | 19 |
| 2.4 Transcript Variants of the Porcine Glucocorticoid Receptor Gene (<i>NR3C1</i>) | 20 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3 | Diskussion | 21 |
| 3.1 | <i>NR3C1</i> als Kandidatengen | 21 |
| 3.1.1 | Kandidatengen für die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen- Nebennieren-Achse | 22 |
| 3.1.2 | Kandidatengen für produktive Merkmale | 23 |
| 3.2 | Struktur des porcinen <i>NR3C1</i> | 24 |
| 3.3 | Effekte der p.Ala610Val Substitution des Glucocorticoid-Rezeptors auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse | 25 |
| 3.4 | Die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse als Selektionskriterium in der Tierzucht | 29 |
| 3.5 | Fazit und Ausblick | 30 |
| | Zusammenfassung | 32 |
| | Literaturverzeichnis | 34 |
| | Danksagung | 50 |
| | Selbstständigkeitserklärung | 51 |
| | Anhang | 52 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|--|
| ACTH | Adrenocorticotropes Hormon |
| Ala, A | Alanin |
| AP1 | <i>engl. activator protein 1</i> |
| Arg, R | Arginin |
| Asn, N | Asparagin |
| Asp, D | Asparaginsäure |
| bp | Basenpaare |
| C | Cytosin |
| CBG | <i>engl. corticosteroid binding globulin</i> (Transcortin) |
| CRH | Corticotropin-releasing Hormon |
| DBD | DNA-Bindedomäne |
| DNA | <i>engl. deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure) |
| G | Guanin |
| Glu, E | Glutaminsäure |
| Gly, G | Glycin |
| GR | Glucocorticoid-Rezeptor |
| GRE | <i>engl. glucocorticoid responsive element</i> |
| GWAS | genomweite Assoziationsstudie |
| His, H | Histidin |
| HPA-Achse | <i>engl. hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis</i> (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse) |
| Ile, I | Isoleucin |
| kb | kilo-Basenpaare |
| LBD | Ligandenbindungsdomäne |
| Leu, L | Leucin |

| | |
|----------------|---|
| Lys, K | Lysin |
| Met, M | Methionin |
| mRNA | <i>engl. messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure) |
| NF- κ B | <i>engl. nuclear factor κB</i> |
| nGRE | <i>engl. negative glucocorticoid responsive element</i> |
| NR3C1 | <i>engl. nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1</i> |
| NTD | N-terminale Domäne |
| POMC | Proopiomelanocortin |
| PVN | <i>lat. Nucleus paraventricularis</i> |
| QTL | <i>engl. quantitative trait loci</i> (Region eines quantitativen Merkmals) |
| QTN | <i>engl. quantitative trait nucleotide</i> (Nukleotid eines quantitativen Merkmals) |
| Ser, S | Serin |
| SNP | <i>engl. single nucleotide polymorphism</i> (Einzelbasensubstitution) |
| T | Thymin |
| UTR | <i>engl. untranslated region</i> (untranslatierter Bereich) |
| Val, V | Valin |

Darstellungsverzeichnis



| | | |
|----------------|--|----|
| Darstellung 1: | Signaltransduktion innerhalb der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) und Effekte ausgehend vom Stresshormon Cortisol. | 4 |
| Darstellung 2: | Überblick über die funktionellen Domänen des porcinen Glucocorticoid-Rezeptors.. | 6 |
| Darstellung 3: | Glucocorticoid-induzierte Aktivierung des Glucocorticoid-Rezeptors und Effekte auf die Regulation der Genexpression.. | 8 |
| Darstellung 4: | Überblick über die physiologischen Effekte von Glucocorticoiden ausgehend vom aktivierten Glucocorticoid-Rezeptor. | 10 |
| Darstellung 5: | Auswirkungen der p.Ala610Val Substitution auf die Rezeptor-Ligand-Interaktion des porcinen Glucocorticoid-Rezeptors. | 28 |

Stress bezeichnet den Zustand des Organismus, bei dem das innere Gleichgewicht – die Homöostase – durch externe und interne Stressoren gestört ist. Alle Prozesse, die der Vermeidung oder der Bekämpfung der Stressoren dienen und zur Wiederherstellung der Homöostase führen, werden unter dem Begriff Stressantwort zusammengefasst. Grundlegende physiologische Vorgänge, die innerhalb der Stressantwort ablaufen, konnten durch Studien an spezifischen Tiermodellen oder an Patienten mit einer gestörten Stressantwort erforscht werden (zusammengefasst in [1]). Dabei zeigte sich spezieübergreifend eine hohe interindividuelle Variabilität in der Stressantwort, die eine starke genetische Komponente besitzt [2,3]. Aus genetischer Sicht sind derartige komplexe Merkmale schwer zu entschlüsseln, da viele hundert Gene mit unterschiedlich großen Beiträgen beteiligt sind und synergistisch die Manifestation des Merkmals bestimmen [4].

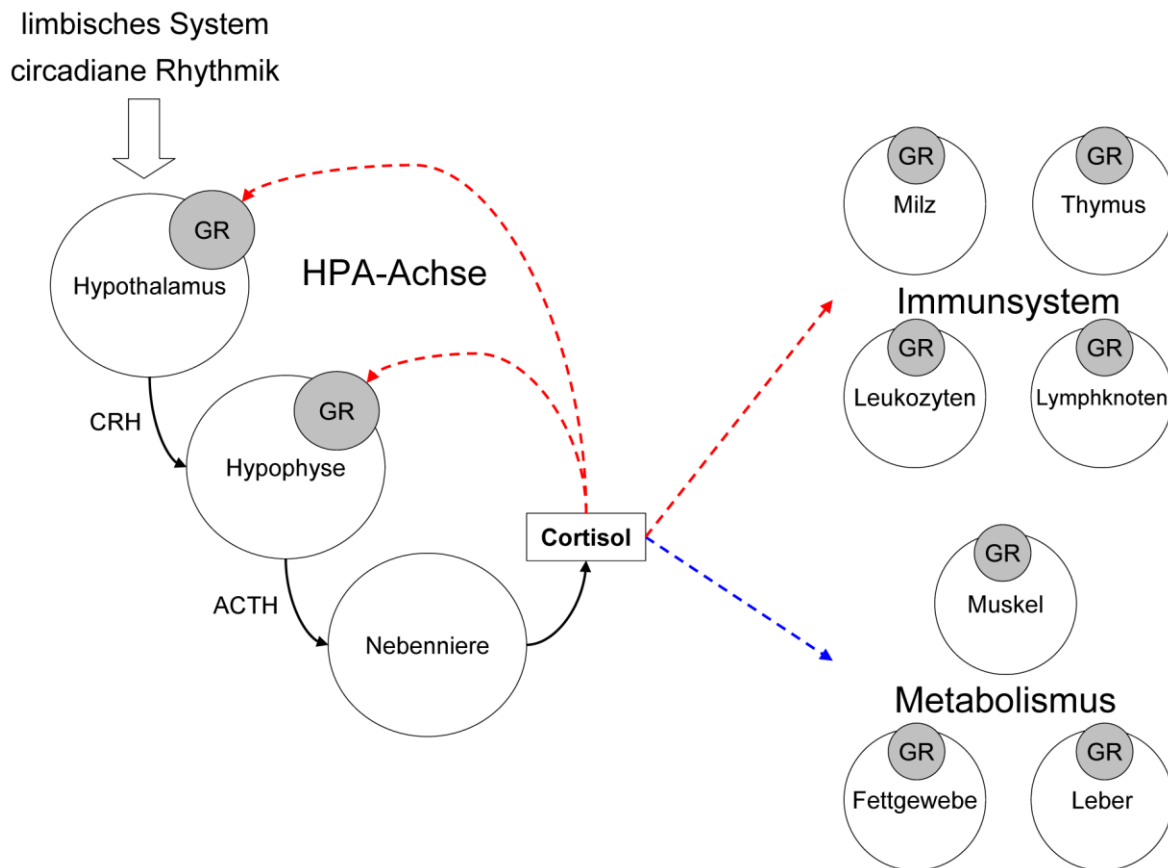
Die Berücksichtigung der Stressempfindlichkeit in der Züchtung von Nutztieren gewinnt zunehmend an Bedeutung. So sind Schweine zahlreichen psychosozialen und physischen Stressoren und komplexen Stresssituationen ausgesetzt, die unter anderem durch Rangverhalten, Absetzen der Ferkel, Transport der Tiere und Klimaschwankungen ausgelöst werden [5-7]. Dabei kann eine züchterisch manifestierte genetische Stressanfälligkeit das Adaptationsvermögen der Tiere reduzieren und die Produktqualität negativ beeinflussen [8]. Vorangegangene Assoziationsanalysen von Kandidatengenen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse, einem der wesentlichen Systeme der Stressantwort, erbrachten erste Hinweise auf das für den Glucocorticoid-Rezeptor (GR) kodierende Gen *NR3C1* (*nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1*) im Zusammenhang mit aggressivem Verhalten und Stressempfindlichkeit beim Hausschwein (*Sus scrofa domestica*) [9]. Im Kontext der vielfältigen Funktionen des Rezeptors als Vermittler der physiologischen Effekte der Stressantwort und der Schlüsselfunktion in der negativen Rückkopplung der HPA-Achse gilt *NR3C1* als ein interessantes funktionelles Kandidatengen für die hohe interindividuelle Variation von Stressempfindlichkeit, Tiergesundheit und produktivem Adaptationsvermögen beim Schwein.

1.1 Literaturüberblick

1.1.1 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse

Die HPA-Achse bezeichnet das Zusammenspiel der drei namensgebenden Gewebe und ist eines der wichtigsten Systeme für die Vermittlung der Stressantwort und die Steuerung von Aktivitäts- und Ruhephasen in Abhängigkeit vom circadianen Rhythmus [10,11]. Sensorische Informationen werden von limbischen Strukturen des Hippocampus, der Amygdala und des präfrontalen Cortex verarbeitet und bewertet. Das Ziel des Organismus ist es, die Homöostase aufrecht zu erhalten und bei Störung der Homöostase die physiologischen Voraussetzungen zur *fight or flight* Antwort und zur Stressbewältigung zu initiieren. Schlüsselpositionen innerhalb der HPA-Achse (Darstellung 1) sind: die Bildung von Corticotropin-releasing Hormon (CRH) und Vasopressin in den parvozellularen Neuronen des hypothalamischen Nucleus paraventricularis (PVN); das in der Hypophyse synthetisierte Proopiomelanocortin (POMC) als Präkursor des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH); und die Synthese von Corticosteroiden im Nebennieren-Cortex (*Zona fasciculata*) [11]. Damit werden als Stressoren bewertete Impulse durch die HPA-Achse auf die physiologische Ebene transportiert und durch die Konzentration von Corticosteroiden im Blutkreislauf entsprechende Effekte vermittelt. Der wesentliche Rezeptor zur Bindung der freien Corticosteroide (hauptsächlich Cortisol bei Mensch und Schwein und Corticosteron bei Nagetieren) und damit für die Vermittlung der physiologischen Stressantwort ist der Glucocorticoid-Rezeptor (GR). Die Affinität des GR zum Liganden Cortisol ist so ausgelegt, dass der Rezeptor durch hohe Cortisol-Konzentrationen aktiviert wird und anschließend als Transkriptionsfaktor zahlreiche Effekte im gesamten Organismus vermittelt [12]. Eine Hauptfunktion des GR ist die negative Rückkopplung der Stressantwort durch die Interaktion mit Glucocorticoiden, insbesondere im Hypothalamus, der Amygdala und im Hippocampus. Die schnelle Rückkopplung der HPA-Achse tritt bereits nach Sekunden bis Minuten ein und erfolgt wahrscheinlich über transkriptionsunabhängige Mechanismen [13]. Die langsame negative Rückkopplung der Stressantwort verläuft vor allem über Effekte auf die Genexpression, wie z.B. die GR-abhängige Regulation des *POMC*-Promoters [14]. Weiterhin wird die HPA-Achse unter anderem durch Hormone, Neurotransmitter (z.B. Serotonin) und Cytokine (z.B. Interleukin-1 β , Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor- α) reguliert [15].

Die Aktivität der HPA-Achse kann in verschiedenen Phasen der Stressreaktion durch die Analyse von Intermediaten der HPA-Achsen-Signaltransduktion abgebildet werden. Cortisol, als Mediator der physiologischen Reaktion auf Stressoren, und ACTH, welches die Produktion von Cortisol in der Nebennierenrinde induziert, sind dabei wesentliche Biomarker für die akute Stressantwort. Chronische Abnormalitäten der Stressantwort äußern sich vor allem durch Effekte auf das Nebennierengewicht, induziert durch Hyperplasie und Hypertrophie. Ermittelte Heritabilitäten dieser Parameter zeigen einen moderaten bis hohen Anteil der Genetik an der Merkmalsausprägung. Die Heritabilität des Nebennierengewichtes wird bei der Maus auf etwa 27% geschätzt [16] und beim Schwein weisen ältere Studien einen Anteil von 50-60% der genetischen Komponente zu [17]. Für basale Cortisolwerte beim Schwein sind Heritabilitäten von ca. 18% [18] bis hin zu 40-70% [19] beschrieben. Die genetische Disposition für individuelle Unterschiede in der HPA-Achsen-Aktivität spiegelt sich auch in der Domestizierung verschiedener Spezies im Zusammenhang mit der Züchtung auf Zahmheit wider. Bei Ratten (*Rattus norvegicus*), Füchsen (*Canis familiaris*) und Meerschweinchen (*Cavia aperea*) konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass die Domestizierung mit einer verringerten Aktivität der neuroendokrinen Stressachse, unter anderem in Form von kleineren Nebennieren und geringeren Corticosteroid-Konzentrationen im Blut, einhergeht [20-22]. Auch Hausschweinerassen haben im Vergleich zu Wildschweinen geringere Cortisol-Spiegel und zeigen, auch innerhalb der domestizierten Rassen, starke Unterschiede in der basalen und/oder stressinduzierten HPA-Achsen-Aktivität [23]. Insbesondere aufgrund der starken Abhängigkeit der Stressreaktion von Umweltfaktoren konnten durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) bislang nur einige QTL für die Parameter der HPA-Achsen-Aktivität identifiziert werden [3,24]. Dabei deuteten die Ergebnisse dieser Studien darauf hin, dass die wesentlichen Komponenten innerhalb der Stressantwort kaum Anteil an der interindividuellen Variation haben. Das impliziert zum einen stark konservierte Prozesse innerhalb der HPA-Achse, und zum anderen den wesentlichen Einfluss regulierender Faktoren auf die genetische Variabilität der Stressantwort.



Darstellung 1: Signaltransduktion innerhalb der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) und Effekte ausgehend vom Stresshormon Cortisol. Rote Linien symbolisieren inhibitorische Effekte, blaue und schwarze Linien aktivierende Effekte. GR: Glucocorticoid-Rezeptor; CRH: Corticotropin-releasing Hormon; ACTH: Adrenocorticotropes Hormon. (Schema adaptiert aus [25].)

1.1.2 Struktur und Funktion des Glucocorticoid-Rezeptors

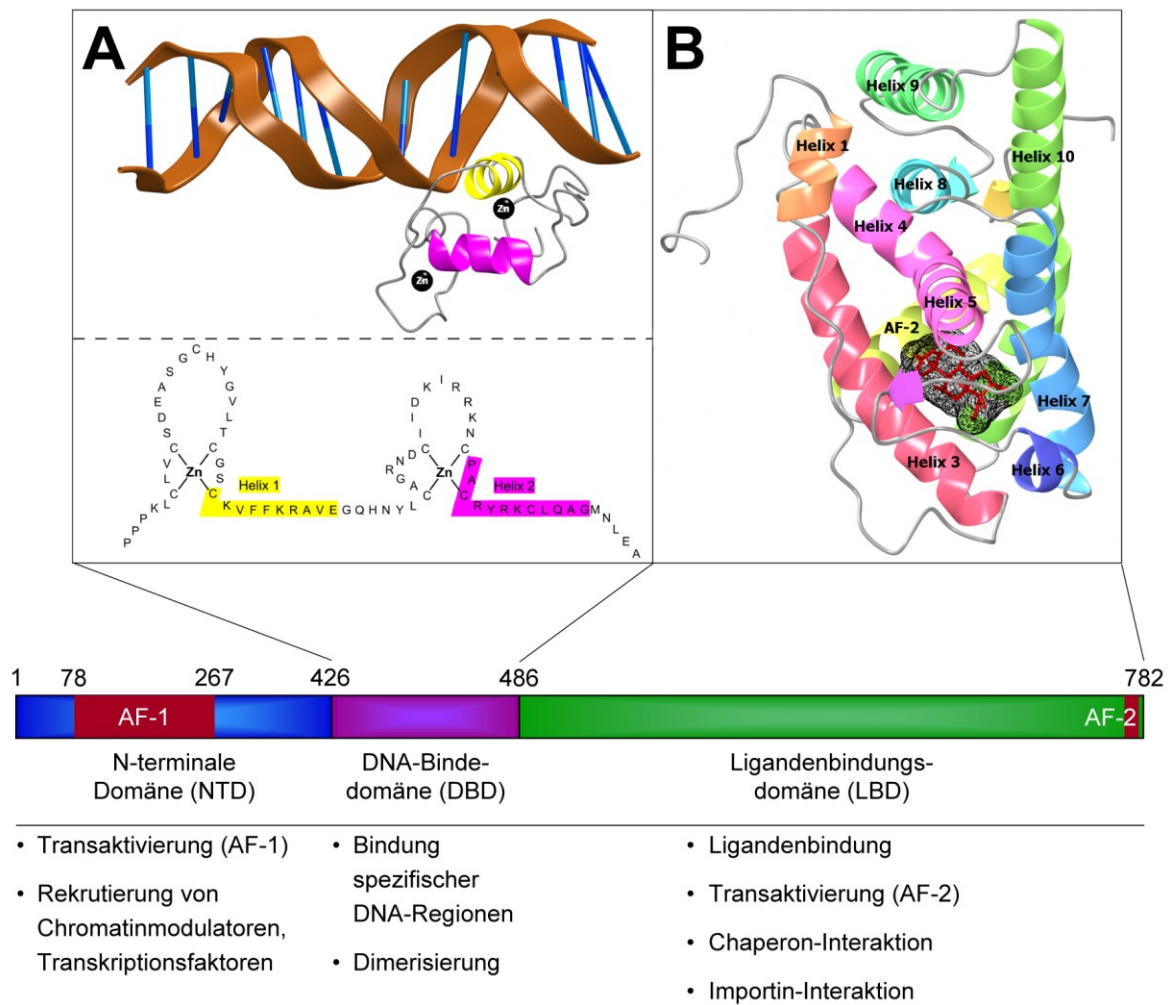
1.1.2.1 Strukturelle Diversität des humanen und porcinen Glucocorticoid-Rezeptors

Das Schwein hat eine zentrale wirtschaftliche Bedeutung für die Produktion tierischer Proteine und gewinnt, aufgrund der hohen physiologischen und genetischen Ähnlichkeit zwischen Mensch und Schwein, zunehmend an Bedeutung für die Modellierung humaner Erkrankungen [26,27]. Basierend auf den genetischen Übereinstimmungen liefern vorangegangene Analysen des GR-kodierenden *NR3C1* beim Menschen grundlegende Erkenntnisse zur Struktur, Prozessierung und molekularen Funktionsweise und schaffen

damit initiale Hinweise für die molekularbiologische Charakterisierung des porcinen *NR3C1*.

Der GR zählt wie alle Steroidhormon-Rezeptoren zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Das porcine *NR3C1* liegt in der Nähe der Telomerregion des langen Arms von *Sus scrofa* Chromosom 2 (umfasst etwa 100kb) und konnte im Markerintervall von SW1879 bis SWR308 kartiert werden [9]. Beim Menschen ist das Gen auf Chromosom 5 (ca. 160kb) lokalisiert. Die Genstruktur beinhaltet neun Exons, von denen die Exons 2 bis 9 kodierend sind. Das nicht-kodierende erste Exon liegt im 5'-untranslatierten Bereich (UTR) des *NR3C1* und kommt spezieübergreifend in mehreren alternativen Varianten vor, die zur Transkription von individuellen *leader*-Sequenzen führen [28-30]. Zusätzlich tragen auch alternative Translationsstartpunkte und alternatives Spleißen der kodierenden Exons zur hohen Diversität an *NR3C1*-Transkripten und Rezeptorisoformen bei. Beim Menschen sind die Isoformen GR-alpha, GR-beta, GR-gamma, GR-P und GR-A als alternative Spleißprodukte und acht potentielle Translationsstartpunkte bekannt [31]. Die Diversität, basierend auf den Isoformen und den alternativen *leader*-Sequenzen mit entsprechend individuellen Promotoren, trägt wesentlich zur gewebe- und kontextspezifischen Funktion des ubiquitär exprimierten GR bei [32,33].

Die Proteinsequenzen des porcinen und humanen GR weisen eine Homologie von 90% auf. Die ubiquitär exprimierte und funktionell aktive Rezeptorform – GR-alpha – umfasst beim Menschen 777 Aminosäuren. Die porcine GR-alpha Variante besteht aus 782 Aminosäuren, während andere Proteinisoformen beim Schwein nicht näher charakterisiert sind. Die Proteinstruktur des Rezeptors gliedert sich in die N-terminale Domäne (NTD), die DNA-Bindedomäne (DBD) und die Ligandenbindungsdomäne (LBD) (Darstellung 2). Je nach Rezeptorisoform sind einzelne Teile dieser Domänen verändert oder eliminiert, wodurch sich die Isoformen zum Teil deutlich in ihrer Funktion unterscheiden [31].

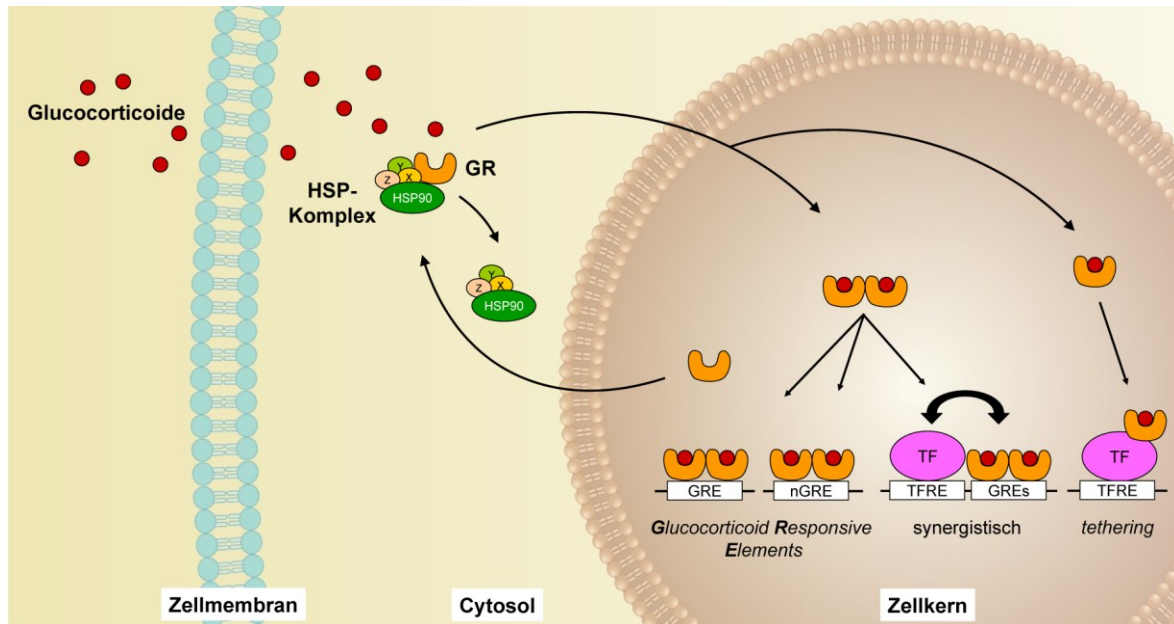


Darstellung 2: Überblick über die funktionellen Domänen des porcinen Glucocorticoid-Rezeptors.

Die Annotation der einzelnen Domänen innerhalb der Aminosäuresequenz des porcinen GR erfolgte entsprechend den strukturellen Analysen des humanen GR [34,35]. Die Proteinstrukturen der DNA-Bindedomäne (Kristallstrukturdaten von Luisi *et al.* (1991) verwendet [36]) und der Ligandenbindungs-domäne (kristallographische Daten des murinen GR von Seitz *et al.* (2010) verwendet [37]) wurden durch Alignment an das porcine Ortholog angepasst (WinCoot Version 0.6.2) und mit der CCP4mg Software dargestellt [38]. (A) Die DBD besteht aus zwei Zinkfinger-Motiven, die jeweils zur Stabilisierung einer α -Helix beitragen. Die α -Helix 1 (gelb) liegt in der großen Tasche der doppelsträngigen DNA und α -Helix 2 (magenta) ist über der kleinen Tasche der DNA lokalisiert [39]. (B) Das Proteinmodell der LBD zeigt die Interaktion des GR mit Dexamethason (rot/schwarz). AF: *activation function*. (Darstellung adaptiert aus [35].)

1.1.2.2 Funktionsweise des Glucocorticoid-Rezeptors

Der überwiegende Teil der inaktiven GR – ohne gebundenen Liganden – ist im Komplex mit verschiedenen Hitzeschockproteinen und Immunophilinen, welche die LBD des Rezeptors in einer offenen Konformation stabilisieren, im Cytoplasma der Zelle lokalisiert (Darstellung 3). Nach der Bindung von Glucocorticoiden löst sich der stabilisierende Komplex und das ligandengebundene Rezeptormonomer transloziert in den Zellkern. Dort bilden zwei GR-Monomere in der Regel ein Homodimer und können über die DBD mit DNA-Regionen interagieren. Bislang sind zwei Arten von Erkennungssequenzen in der DNA bekannt, mit denen das Rezeptordimer interagieren kann. Eine davon sind die *glucocorticoid responsive elements* (GRE), durch deren Bindung der GR positive Effekte auf die Genexpression induziert. Die GRE sind unvollständige palindromische Sequenzen, bestehend aus zwei invertierten 6bp Motiven (TGTTCT), die durch drei nicht-konservierte Basenpaare voneinander getrennt sind [40]. Nach der Bindung werden vor allem durch die NTD des Rezeptors Chromatin-Modulatoren und Coaktivatoren (z.B. SRC1, TIF2/SRC2 und SRC3) aktiviert, die für die Initiation der Transkription entscheidend sind [41]. Die zweite Art von Erkennungssequenzen wird als *negative GRE* (nGRE) bezeichnet und ist weniger konserviert als die GRE-Sequenz. Die Interaktion des GR mit nGRE fördert die Anlagerung des Rezeptors an Corepressoren und induziert negative Effekte auf die Genexpression [42]. Zudem können die genannten Erkennungssequenzen gekoppelt mit Bindungsstellen für andere Faktoren auftreten, wodurch die Effekte auf die Genexpression synergistisch vermittelt werden [43]. Ein weiterer Mechanismus basiert, unabhängig von der Bindung des GR an spezifische DNA-Sequenzen, auf der Protein-Protein-Interaktion mit Transkriptionsfaktoren und Coaktivatoren. Für solche als *tethering* GRE bezeichneten Wechselwirkungen sind bislang ausschließlich reprimierende Effekte auf die Genexpression, vor allem über die Bindung von *nuclear factor* κ B (NF- κ B) und *activator protein* 1 (AP1), nachgewiesen [44]. Durch diese Mechanismen der Genregulation ist der GR in der Lage, diverse Effekte in unterschiedlichen zeitlichen und gewebespezifischen Zusammenhängen zu vermitteln. Insgesamt zeigen genomweite Analysen, dass etwa 5-20% der Gene des Genoms durch den GR reguliert werden [45,46].



Darstellung 3: Glucocorticoid-induzierte Aktivierung des Glucocorticoid-Rezeptors und Effekte auf die Regulation der Genexpression. Glucocorticoide diffundieren aus dem Interzellularraum in die Zelle und binden dort an den durch Chaperone in einer offenen Konformation stabilisierten GR. Durch die Interaktion mit Glucocorticoiden kommt es zur Translokation des Rezeptors durch Importinkanäle in den Zellkern. Die GR-abhängige Regulation der Genexpression erfolgt über die dargestellten grundlegenden Mechanismen. GR: Glucocorticoid-Rezeptor; HSP: Hitzeschockprotein; GRE: *glucocorticoid responsive element*, nGRE: *negative glucocorticoid responsive element*; TF: Transkriptionsfaktor, TFRE: Transkriptionsfaktor *responsive element*; X, Y, Z: Immunophiline. (Darstellung adaptiert aus [47], Hintergrund erzeugt mit Ingenuity Pathways Analysis, Ingenuity Systems.)

1.1.2.3 Physiologische Effekte des Glucocorticoid-Rezeptors

Das Stresshormon Cortisol wird, induziert durch die HPA-Achse, in der Nebenniere gebildet und von dort in den Blutkreislauf ausgeschüttet. Im Blutplasma werden 80-90% des Cortisols vom Transcortin (CBG – *Corticosteroid binding globulin*) gebunden [48]. Transcortin inaktiviert das gebundene Cortisol und transportiert das Molekül durch den Blutkreislauf in den gesamten Organismus. Am Zielgewebe kann Cortisol in ungebundener Form durch die Plasmamembran diffundieren und am cytoplasmatisch lokalisierten GR binden. Dadurch werden die physiologischen Effekte der Stressantwort, insbesondere auf den Energiestoffwechsel, das Immunsystem und die Regulation der HPA-Achse, vermittelt [1].

Neben Cortisol gibt es zahlreiche synthetische Glucocorticoide, wie z.B. Dexamethason, Prednisolon und Triamcinolon, die in vielfältigen klinischen Gebieten zum Einsatz kommen [49]. Diese Cortisol-Derivate unterscheiden sich in ihrer spezifischen Halbwertszeit und biologischen Wirksamkeit und werden zur Behandlung von akuten und chronischen Erkrankungen wie z.B. endokrinen Erkrankungen, Hauterkrankungen, rheumatischen Erkrankungen, hämolytischen Erkrankungen, Atemwegserkrankungen, Nierenerkrankungen und Erkrankungen des Nervensystems verwendet [50]. Basierend auf der intensiven Verwendung von Glucocorticoiden in der Medizin sind spezifische Effekte der Interaktion von Glucocorticoiden und dem GR in verschiedenen Geweben erforscht und einige der grundlegenden molekularen Mechanismen identifiziert. Die nachfolgende Übersichtstabelle (Darstellung 4) fasst die wesentlichen Effekte der Glucocorticoid-GR-Interaktion auf Organe des Immunsystems, der neuroendokrinen Stressantwort und ausgewählte Organe des Energiestoffwechsels zusammen. Neben einigen bekannten Interaktionspartnern und regulierten Genen sind wesentliche Nebenwirkungen dargestellt, die durch die chronische Verabreichung von Glucocorticoiden hervorgerufen werden.

Darstellung 4: Überblick über die physiologischen Effekte von Glucocorticoiden ausgehend vom aktivierten Glucocorticoid-Rezeptor.

| | Effekte von Glucocorticoiden | Folgen chronischer Glucocorticoid-Gabe | Regulierte Gene/ Proteine | Quellen |
|----------------------|---|--|---|--------------|
| Skelettmuskel | ↑Proteinabbau, ↓Proteinsynthese, ↓Glykogensynthese, ↓Insulin-Signalwege, ↓Transport von Aminosäuren in den Muskel, ↓Glukoseaufnahme in periphere Organe | Muskelatrophie, Muskelschwäche (peripher und respiratorisch), Zellschädigung, Insulinresistenz, ↓mitochondriale oxidative Kapazität, ↓Myogenese, Wachstumsretardierung | <i>CBLB, CEBPB, CTSL, DDIT4, FBXO32, FOXO1, FOXO3, GLUT4, GRB10, KLF15, MAOA, MSTN, MURF-1, MYOG, PIK3R1, PDK4, SORBS1, UBC</i> | [1,51-59] |
| Fettgewebe | Regulation der Lipidhomöostase: ↑Lipolyse (Nahrungsmangel), ↑Lipogenese (Nahrungsüberschuss), Lipidtransport, Lipidspeicherung; ↑Differenzierung von pre-Adipozyten und zelluläre Hypertrophie (zentrales Fettgewebe), ↓Thermogenese (braunes Fettgewebe) | Adipositas, Fettstoffwechselstörung, Hypertonie, ↑Risiko für Typ-2-Diabetes, Gewichtszunahme, Hyperplasie des Fettgewebes | <i>ACACA, ACACB, AGPAT2, AGPAT3, AGPAT4, ANGPTL4, CD36, FASN, LIPE, LPIN1, LRP1, MGLL, PDE3B, PLIN4, PNPLA2, SCD1, SCD2, SCD3, SLC27A2, VLDLR</i> | [1,60-63] |
| Leber | ↑Gluconeogenese, ↓Hydrolyse von Triglyceriden, Glykogenmetabolismus, Transport von Gallensäure | Fettleber: ↑Triglyceridsynthese, ↓β-Oxidation, ↑Einlagerung von Fetten in der Leber, ↑ <i>Very low density lipoprotein</i> Produktion und Ausschüttung | <i>APOA1, APOA4, CDKN1A, G6PC, HES1, LCN2, MED1, MEGF9, MRAP, MT1, MT2A, NFIL3, PCK2, SDS, SLC10A1, SULT1E1, TAT, TDO2, TFF3</i> | [1,62,64-66] |
| Knochenmark | Regulation der Differenzierung und Funktion mesenchymaler Zellen und des renalen und intestinalen Ca^{2+} -Haushalts | ↓Knochenaufbau: ↑Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten, ↓Differenzierung und Reifung von Osteoblasten, ↑Knochenresorption/ Osteoklasten | <i>API1, BGLAP, BMP2, BMP6, BMP8B, CASP3, CSF1, DKK1, GSK3B, IBSP, IGF1, LIF, MMP1, MMP13, PPARγ, SOST, SPPI, TNFSF11</i> | [47,67-69] |
| Nebenniere | ↑Adrenalin-Biosynthese, ↓Noradrenalin-Aufnahme, ↑Katecholamin-Speicherung | exogenes Cortisol: Suppression der Nebenniere; chronischer Cortisolmangel: Hypertrophie und Hyperplasie des Cortex, ↓Differenzierung von Chromaffinzellen | <i>AChR, CHGA, PNMT, SLC6A2, TH</i> | [70-74] |

| | Effekte von Glucocorticoiden | Folgen chronischer Glucocorticoid-Gabe | Regulierte Gene/ Proteine | Quellen |
|---------------------|--|---|--|---------------|
| Immunsystem | antiinflammatorische und immunsuppressive Effekte durch Regulation wesentlicher Signalwege: ↓NFκB, ↓AP-1, ↓MEK-ERK, ↓Akt; | ausgedehnte Immunsuppression, ↓proliferative Aktivität von Keratinozyten und Hautfibroblasten: | <i>ANXA1, CC10, COX2, DOK1, DUSP1, DUSP1, GILZ, GPR65,</i> | [25,49,75-81] |
| Leukozyten | ↓Proliferation von T-Zellen, ↑Differenzierung regulatorischer T-Zellen, | Atrophie der Haut, | Interleukine, | |
| Lymphknoten | ↓Prostaglandinproduktion, ↓Sekretion von Cytokinen aus Makrophagen | Akne, ↓Wundheilung; | Keratine, <i>MIF, NFKB1A, NF-kB, NOS2, RASD1,</i> | |
| Milz | | Grauer Star, | <i>RHOB, Raf, Ras, SCF, SLPI, STAT1, STAT3, STAT5, TNF, ZFP36</i> | |
| Thymus | | Osteoporose, Aktivierung latenter Viren | | |
| Hirnareale | negative Rückkopplung der HPA-Achse: ↓Stress-induzierte neuronale (PVN) Aktivität, ↓CRH-Ausschüttung; | Schädigung der Pyramidenzellen: Umstrukturierung der Dendriten der CA3 Pyramidenzellen, | <i>ADORA2B, GPD1, BDNF, CGA, CHOP3, CRH, CSNK2A1, DCLK1, DDIT4L, DUSP1, EGR2, ERFF11, FKBP5, GADD45G, GFAP, GJB6, GLUL, HES5, ID3, KLF9, MT1A, NDRG2, PHLDA1, POMC, PRL, PRODH, SGK1, SULT1A1, TGFB1, TXNIP, WNT7A</i> | [82-92] |
| Amygdala | Gedächtnisbildung: ↑Konsolidierung von Informationen im Langzeitgedächtnis; | verringerte neuronale Synapsen, Atrophie der apikalen Dendriten der CA3-Neuronen; | | |
| Hippocampus | Morphologie und Überleben von Neuronen: | ↓neuronaler Zellumsatz: ↓Apoptose, | | |
| Hypophyse | Differenzierung, Zelladhäsion, Plastizität, ↑Wachstum, ↑Axogenese; neuronaler Energiemetabolismus, akuter Stress : ↓ <i>long term potentiation</i> , ↑Apoptose, ↓Zellproliferationsrate | ↓Neurogenese; Verhaltensveränderung: Ängstlichkeit, Defizite im Lern- und Erinnerungsvermögen, depressivartiges Verhalten | | |
| Hypothalamus | | | | |
| präfrontaler Cortex | | | | |
| | | | | |

1.1.2.4 Mutationen des Glucocorticoid-Rezeptors

Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Domänen des GR sind innerhalb der Wirbeltiere unterschiedlich stark konserviert. So ist die Sequenz der N-terminalen Domäne (NTD) geringer konserviert als die der DNA-Bindedomäne (DBD) und der Ligandenbindungsdomäne (LBD). Dies deutet auf speziesspezifische Unterschiede in der Signaltransduktion ausgehend von der NTD des GR hin, aber impliziert universelle Mechanismen der DNA- und Ligandenbindung [93,94]. Durch zahlreiche Studien von künstlich erzeugten Mutationen und natürlich auftretenden Polymorphismen des GR in verschiedenen Spezies zeigen sich die Auswirkungen von Sequenzabweichungen in den einzelnen Domänen und

der Beitrag von natürlichen Polymorphismen an der interindividuellen Variation der Rezeptorfunktion:

Die NTD des GR, insbesondere die *activation function* (AF)-1 Region (Aminosäure 77-262 des humanen GR), ist entscheidend für die zielgenspezifische Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren und die damit verbundene Initiation oder Repression der Genexpression [34,95]. Dabei spielt die hohe Plastizität der gesamten NTD eine entscheidende Rolle und beeinflusst die Struktur der AF-1 Region [96]. Studien basierend auf Mutationen der NTD des humanen GR (z.B. ER22/23EK und N363S) zeigen dementsprechend unterschiedliche Effekte auf die Transaktivierungskapazität in Abhängigkeit von der Lokalisation der Mutation [97]. Die Substitution N363S (Austausch von Asparagin nach Serin an Aminosäureposition 363) induziert eine leicht erhöhte transkriptionelle Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor und führt zu einer verstärkten Sensitivität für Glucocorticoide [97,98]. Im Gegensatz dazu resultiert die ER22/23EK Substitution in einer verringerten Transaktivierung durch den GR und äußert sich auf phänotypischer Ebene in der Unempfindlichkeit für Glucocorticoide (Glucocorticoid-Resistenz) [97,99].

Die DBD besteht aus zwei Zinkfinger-Motiven, welche den Kontakt mit der DNA herstellen. Erste Untersuchungen von Mutationen in dieser Domäne erfolgten an Mausmutanten bei denen durch einen gezielten Aminosäureaustausch die Fähigkeit zur DNA-Bindung fehlte [73]. Die mutierte GR-Variante war somit nur in der Lage, DNA-unabhängige Effekte über Protein-Protein-Interaktion zu induzieren. Die beiden einzigen natürlichen Mutationen der DBD des humanen GR beeinflussen analog dazu die Fähigkeit des Rezeptors zur Interaktion mit Glucocorticoid-sensitiven Bereichen der DNA. *In vitro* Untersuchungen der Mutationen bestätigen in diesem Zusammenhang den vollständigen oder teilweisen Verlust der Transaktivierungskapazität des mutierten GR (z.B. R477H [100] bzw. V423A [101]).

Die LBD des GR besteht aus elf α -Helices und zwei β -Faltblättern die sich zu einer dreischichtigen Proteindomäne formen (Darstellung 2; die Nummerierung der Helices basiert auf der allgemeinen Kristallstruktur der LBD von nukleären Rezeptoren, daher hat die GR-LBD keine Helix 2) [102]. Entscheidend für die Formation der Bindungstasche sind dabei die Aminosäureseitenketten der Helices 3, 4, 5, 6, 7 und 10 sowie des ersten β -Faltblattes. Die Bindung des Liganden induziert Konformationsänderungen in der LBD und führt zur Umlagerung und Aktivierung der Helix 11 (aufgrund der AF-2 Region auch als AF-2 Helix bezeichnet) und des stabilisierenden C-terminalen β -Faltblattes. Mutationen

der LBD beeinflussen primär die Bindungsaffinität zum Liganden durch direkten Einfluss auf die Rezeptor-Ligand-Interaktion oder indirekt durch die veränderte Faltung des Rezeptors (z.B. D641V [103], M604L [104] und G679S [100]). Weiterhin kann auch die AF-2 Helix durch Mutationen wie z.B. V729I [105] und I747M [106] beeinflusst sein. Die molekularen Analysen entsprechender Mutationen der LBD zeigen insbesondere die verringerte Bindungsaffinität zum Liganden, das reduzierte Potential zur Transaktivierung und Effekte auf die Translokation des Rezeptors. Mutationen, welche die Coaktivator-Rekrutierung an die LBD beeinflussten, zeigen vor allem Auswirkungen auf die Transaktivierung (z.B. V571A [107] und V575M [108]). Auf physiologischer Ebene resultieren Mutationen der LBD vor allem in der Ausprägung verschiedener Stufen der Glucocorticoid-Resistenz mit entsprechenden phänotypischen Effekten [109].

1.1.3 Die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse als Merkmal der Stressempfindlichkeit in der Schweinezucht

Es gibt drei wesentliche Argumente, die für die zunehmende Berücksichtigung der Stressempfindlichkeit in der Schweinezucht sprechen:

- (i) Die Stressempfindlichkeit der Tiere hat primären Einfluss auf die Produktqualität. Unter stressinduzierten Bedingungen werden katabole Prozesse vorangetrieben, die der Bereitstellung von Energiereserven dienen. Dementsprechend zeigen Schweine, die chronischen Stressoren (z.B. hohen Temperaturen und Platzmangel) ausgesetzt sind, ein verringertes Wachstum und einen höheren Fettansatz [110,111]. Akute Stresssituationen, ausgelöst z.B. durch Transportprozesse oder während der Schlachtung, können außerdem die metabolischen Verhältnisse im Organismus stören und beispielsweise negative Effekte auf essentielle Abläufe innerhalb der Fleischreifung induzieren [112,113].
- (ii) Das Adaptationspotential und die Robustheit der Tiere sind für die optimale Nutzung des genetischen Potentials und das Erreichen eines hohen Produktionsniveaus entscheidend [114]. Dies gilt besonders im Hinblick auf Klimaschwankungen und die Verwendung unterschiedlicher Produktionssysteme, die einer schnellen und spezifischen Anpassung durch die Tiere bedürfen.

- (iii) Die Stressempfindlichkeit von Nutztieren steht im engen Zusammenhang mit dem Wohlbefinden der Tiere und der Anfälligkeit für Krankheiten [115]. Ein vermindertes Adaptationspotential gegenüber Stressoren, und die daraus resultierende chronisch aktivierte HPA-Achse, kann sich negativ auf das Verhalten der Tiere auswirken, das Immunsystem schwächen und die Ausprägung von Krankheiten begünstigen. In Abhängigkeit vom zeitlichen Auftreten und der Intensität der Stressoren können zudem auch weitere tiergesundheitliche Aspekte, wie z.B. die Entwicklung der Tiere und die Reproduktionsfähigkeit, gestört sein.

Der Einfluss der Genetik auf die Stressempfindlichkeit beim Schwein wird am Beispiel des porcinen Stresssyndroms (auch Malignes Hyperthermie-Syndrom) deutlich. Dabei führt ein Defekt im Ryanodin-Rezeptor-Gen einerseits zur Verbesserung des Muskelansatzes, aber ist andererseits auch mit einer erhöhten Stressempfindlichkeit assoziiert [116,117]. Die genetisch prädisponierten Schweine reagieren deutlich intensiver auf Stressoren, was sich auf physiologischer Ebene unter anderem in der Erhöhung von Atemfrequenz, Muskelaktivität und Körpertemperatur widerspiegelt und bis hin zum Tod durch Kreislaufversagen führen kann [118]. Unter Schlachtbedingungen beeinflusst die mit der Mutation assoziierte Stressanfälligkeit der Tiere den Metabolismus bzw. die Fleischreifung und führt in vielen Fällen zu qualitativ schlechtem oder unbrauchbarem Fleisch [112]. Durch die gezielte Analyse der Mutation mittels DNA-Test und die Berücksichtigung in den Zuchtprogrammen, ist das alternative Allel mittlerweile nur noch in speziellen Fleischrassen zu finden [119].

Die Entdeckung der Mutation des Ryanodin-Rezeptors ist neben *IGF2*, welches Einfluss auf das Muskelwachstum beim Schwein hat, eines der wenigen identifizierten *quantitative trait nucleotides* (QTN) mit großem Anteil an der Ausprägung eines komplexen Merkmals [117].

1.2 Zielstellung

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit waren Assoziationsstudien mit dem Ziel, die genetische Komplexität der neuroendokrinen Stressantwort (vermittelt durch die HPA-Achse) beim Schwein zu entschlüsseln. Dabei wurde der Fokus auf das funktionelle Kandidatengen *NR3C1* und dessen Anteil an der Gesamtvariabilität der HPA-Achsen-Aktivität gerichtet. Basierend auf der umfassenden molekulargenetischen Analyse des porcinen *NR3C1* sollten kodierende Polymorphismen und alternative Transkriptvarianten identifiziert werden, die an der interindividuellen Variabilität der Stressantwort und den gewebespezifischen Effekten des GR (kodiert durch *NR3C1*) beteiligt sind. Unter Verwendung von Assoziationsanalysen sollten weiterhin Zusammenhänge der *NR3C1*-Polymorphismen zu Parametern der HPA-Achsen-Aktivität und der Ausprägung produktiver Merkmale in der Schweinezucht untersucht werden. Die Analyse der Diversität der *NR3C1*-Transkripte und -Polymorphismen sollte dazu beitragen, Kenntnisse über die grundlegenden regulatorischen Mechanismen der physiologischen Stressantwort zu gewinnen und molekulare Marker für die Berücksichtigung der Stressempfindlichkeit in der Tierzucht bereitzustellen.

2.1 Zusammenfassung der Veröffentlichungen

Das zentrale Thema dieser Dissertation ist der Glucocorticoid-Rezeptor des Schweins. Jede Studie für sich zeigt wesentliche molekularbiologische und genetische Aspekte die zur komplexen Regulation und vielfältigen Funktion des GR beitragen.

Die Ergebnisse der genomweiten Assoziationsanalysen der ersten Studie verdeutlichten den Anteil des GR-kodierenden Gens *NR3C1* an der Variabilität der HPA-Achsen-Aktivität und bestätigten es als wesentlichen positionellen Kandidat für den Merkmalskomplex Stressantwort und Adaptationsvermögen. Mit dem Ziel potentielle kausale Mutationen zu identifizieren, die zur hohen interindividuellen Variabilität der Stressantwort beitragen, wurde der kodierende Bereich des Gens näher analysiert. Die Aminosäuresubstitution p.Ala610Val in der Ligandenbindungsdomäne war hierbei der Höhepunkt der Studie und zeigte in drei unabhängigen Schweinepopulationen hochsignifikante und konsistente Effekte auf die beiden erhobenen Parameter der neuroendokrinen Stressachse. Die durchgeführten molekularbiologischen Analysen deuteten darauf hin, dass es sich bei der zugrundeliegenden Substitution c.1829C>T um ein QTN für die HPA-Achsen-Aktivität handelt. Detaillierte Informationen zu den Effekten des Polymorphismus gibt Abschnitt 2.2 (Plos One 2012, 7(9), e45518).

Darüber hinaus wurden zwei Aminosäureaustausche (p.Glu13Asp und p.Val19Leu) in der N-terminalen Domäne des GR identifiziert. Diese zeigten keine konsistenten Effekte auf die HPA-Achsen-Aktivität, haben aber aufgrund ihrer Lokalisation potentiellen Einfluss auf die Signaltransduktion des Rezeptors. Daher war das Ziel der zweiten Studie, die Auswirkungen dieser beiden Polymorphismen auf andere relevante Merkmale der Schweineproduktion zu untersuchen und hierbei insbesondere den Einfluss des GR auf physiologische Parameter zu fokussieren. Sowohl für Merkmale der Fleischqualität als auch für Parameter des Schlachtkörpers konnten signifikante Effekte nachgewiesen werden. Nähere Informationen zu den untersuchten Merkmalen und möglichen molekularen Mechanismen sind in Abschnitt 2.3 aufgeführt (Animal Genetics 2014, 45.1, 125-129).

Die ersten beiden Studien unterstreichen die Rolle von *NR3C1* als interessantes Kandidatengenen für verschiedene tierzuchtrelevante Merkmale beim Schwein. Dennoch sind viele der molekularen Grundlagen, insbesondere für die gewebe- und entwicklungsspezifischen Effekte des GR, nicht im Detail bekannt. Ein Faktor für das breite Wirkungsspektrum ist die Diversität der *NR3C1*-Transkripte, welche im Rahmen der dritten Studie analysiert wurde. Die Identifizierung von zehn alternativen ersten Exons und vier Isoformen wurde kombiniert mit *in silico* Analysen und Expressionsdaten um gewebespezifische Unterschiede aufzuzeigen. Neben Transkripten die zur konstitutiven Expression beitragen, konnten spezifische Transkriptvarianten z.B. für neuroendokrinologische Gewebe identifiziert werden. Detaillierte Informationen zu den porcinen *NR3C1*-Transkriptvarianten sind in Abschnitt 2.4 verfügbar (General and Comparative Endocrinology 2013, 189, 127-133).

2.2 A Substitution in the Ligand Binding Domain of the Porcine Glucocorticoid Receptor Affects Activity of the Adrenal Gland

Eduard Muráni, Henry Reyer, Siriluck Ponsuksili, Stephan Fritschka und Klaus Wimmers

Plos One 2012, 7(9), e45518.

Konzeption und Entwicklung der Experimente: EM KW. Durchführung der Experimente: HR SP SF. Analyse der Daten: EM HR SP SF KW. Bereitstellung von Reagenzien, Materialien und Analyseprogrammen: EM HR SP SF KW. Verfassen der Arbeit: EM.

Abstract

Glucocorticoids produced in the adrenal cortex under the control of the hypothalamic-pituitary axis play a vital role in the maintenance of basal and stress-related homeostasis and influence health and well-being. To identify loci affecting regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in the pig we performed a genome-wide association study for two parameters of acute and long-term adrenal activity: plasma cortisol level and adrenal weight. We detected a major quantitative trait locus at the position of the glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) – a key regulator of HPA axis activity. To determine the causal variant(s), we resequenced the coding region of *NR3C1* and found three missense single nucleotide polymorphisms (SNPs). SNP c.1829C>T, leading to a p.Ala610Val substitution in the ligand binding domain, showed large (about 0.6× and 1.2× phenotypic standard deviations for cortisol level and adrenal weight, respectively), and highly significant ($2.1\text{E-}39 \leq \log_{10}(1/p) \leq 1.7\text{E}+0$) negative effects on both traits. We were able to replicate the association in three commercial pig populations with different breed origins. We analyzed effects of the p.Ala610Val substitution on glucocorticoid-induced transcriptional activity of porcine glucocorticoid receptor (GR) *in vitro* and determined that the substitution introduced by SNP c.1829C>T increased sensitivity of GR by about two-fold. Finally, we found that non-coding polymorphisms in linkage disequilibrium with SNP c.1829C>T have only a minor effect on the expression of *NR3C1* in tissues related to the HPA axis. Our findings provide compelling evidence that SNP c.1829C>T in porcine *NR3C1* is a gain-of-function mutation with a major effect on the activity of the adrenal gland. Pigs carrying this SNP could provide a new animal model to study neurobiological and physiological consequences of genetically based GR hypersensitivity and adrenal hypofunction.

2.3 Association of N-terminal Domain Polymorphisms of the Porcine Glucocorticoid Receptor with Carcass Composition and Meat Quality Traits

Henry Reyer, Siriluck Ponsuksili, Klaus Wimmers und Eduard Muráni

Animal Genetics 2014, 45.1, 125-129.

Konzeption und Entwicklung der Experimente: EM HR KW. Durchführung der Experimente: EM HR SP KW. Analyse der Daten: EM HR SP KW. Bereitstellung von Reagenzien, Materialien und Analyseprogrammen: EM HR SP KW. Verfassen der Arbeit: HR EM.

Abstract

The glucocorticoid receptor (GR) is a ubiquitously acting transcription factor that is responsible for mediating the physiological response to stress and adaptation to environmental conditions. Genetic variation of a GR gene (*NR3C1*) may therefore contribute to multiple phenotypic alterations and influence relevant traits of animal production. Here, we examined effects of two non-synonymous mutations of the porcine *NR3C1*, leading to amino acid exchanges p.Glu13Asp (c.39A>C) and p.Val19Leu (c.55G>C) in the N-terminal domain of the GR, on meat quality and carcass composition. In addition, we explored their influence on transcriptional activity of GR *in vitro*. A commercial crossbreed Pietrain × (German Large White × German Landrace) herd ($n = 545$) in which genotypes and relevant traits had been collected was used to perform the association analysis. The single nucleotide polymorphism (SNP) c.55G>C was significantly associated with conductivity and meat color scores. These effects were highly consistent considering the physiological relationship between these traits. Association analysis of SNP c.39A>C also revealed significant effects on closely connected meat quality traits. In addition, SNP c.55G>C showed association with carcass traits, mainly those related to muscle deposition. The molecular mechanism of action of both amino acid substitutions remains obscure because neither showed significant influence on transcriptional activity of GR. Our study emphasizes *NR3C1* as an important candidate gene for muscle-related traits in pigs, but further work is necessary to clarify the molecular background of the identified associations.

2.4 Transcript Variants of the Porcine Glucocorticoid Receptor Gene (*NR3C1*)

Henry Reyer, Siriluck Ponsuksili, Klaus Wimmers und Eduard Muráni

General and Comparative Endocrinology 2013, 189, 127-133.

Konzeption und Entwicklung der Experimente: EM HR KW. Durchführung der Experimente: EM HR SP KW. Analyse der Daten: EM HR SP KW. Bereitstellung von Reagenzien, Materialien und Analyseprogrammen: EM HR SP KW. Verfassen der Arbeit: HR EM.

Abstract

Glucocorticoid receptor (GR) is a transcription factor activated by circulating glucocorticoids and mediates their effects on various biological functions in the body. The final cellular activity of GR is modulated by alternative splicing and cell-type specific expression of its encoding gene *NR3C1*. To enhance the current knowledge of alternative processing of *NR3C1* in mammalian species and to facilitate future studies of its regulation in the pig we explored here structural diversity, and tissue-specific distribution of transcript variants of the porcine *NR3C1*, and the correlation between usage of alternative promoters and alternative splicing. We experimentally identified ten alternatively used untranslated first exons (1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 1H₂ and 1J) and four transcript variants encoding different GR subtypes (GR-alpha, GR-beta, GR-P and GR-gamma). Expression profiling of nine most important target tissues of glucocorticoids revealed that the promoter of exon 1C drives constitutive expression of the predominant GR-alpha subtype. We found compelling evidence that the occurrence of exon 1D influences abundance of the GR-P splice variant, while both seems to play an important role in regulating GR activity in neuroendocrine tissues. Exons 1A and 1B in turn appear to be important for the regulation of the expression of the porcine *NR3C1* in liver and spleen. Our results demonstrate that tissue-specific actions of GR depend on the usage of alternative promoter regions that favour the processing of certain GR subtypes.

Holistische Analysen in verschiedenen Spezies tragen dazu bei, dass die Anzahl an bekannten Kandidatengen, die an der Ausprägung eines komplexen Merkmals wie z.B. der Stressantwort beteiligt sind, stetig zunimmt. Damit rückt die umfassende molekulare Charakterisierung dieser Gene in den Vordergrund. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation fokussierten sich dabei auf die Analyse eines der Schlüsselgene (*NR3C1*, kodiert für den GR) für die Regulation und Vermittlung der physiologischen Stressreaktion. Grundlegende Erkenntnisse über den Merkmalskomplex Stressantwort sind insbesondere beim Menschen aufgrund der Rolle in einer Vielzahl von Krankheiten und Dysregulationen bekannt. In diesem Kontext wird im Rahmen der Diskussion die Rolle von *NR3C1* als multidimensionales Kandidatengen beim Nutztier hervorgehoben. Weiterhin werden sowohl der Beitrag dieser Arbeit zum Kenntnisstand über die genetische Struktur des porcinen *NR3C1* dargestellt als auch die Effekte von Transkriptvarianten und Polymorphismen diskutiert. Dabei liegt der Fokus vor allem auf der p.Ala610Val Substitution, als potentiell kausale Mutation für die Effekte des GR auf die neuroendokrine Stressachse. Abschließend wird die mögliche Berücksichtigung der tierindividuellen Cortisol-Ausschüttung in der Tierzucht erörtert und ein Ausblick gegeben.

3.1 *NR3C1* als Kandidatengen

Glucocorticoide wurden erstmals 1948 für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis beim Menschen eingesetzt und sind seitdem essentiell in der Therapie von nahezu allen immunologischen Erkrankungen [59,120]. Aufgrund des breiten Wirkungsspektrums der Glucocorticoide und der auftretenden Nebenwirkungen rückte auch die Analyse des wesentlichen Rezeptors für die Vermittlung der Cortisol-Effekte in den Mittelpunkt [121]. Daher sind insbesondere für den humanen GR und das kodierende humane *NR3C1* wesentliche Informationen über Struktur, Regulation und Funktion beschrieben. Mutationen des *NR3C1* – vor allem nicht-synonyme Mutationen (mit Auswirkung auf die Aminosäuresequenz) – beim Menschen tragen wesentlich zur hohen Variabilität der

Glucocorticoid-Ausschüttung bei [109,122]. Derartige Dysfunktionen im Glucocorticoid-Haushalt können weitreichende physiologische Konsequenzen induzieren und die Gesundheit beeinträchtigen (siehe Abschnitt 1.1.2.3) [59,123,124]. Insgesamt ist *NR3C1* ein etabliertes Kandidatengen beim Menschen, welches aufgrund der vielfältigen Funktionen von Glucocorticoiden in engem Zusammenhang mit der Immunantwort, dem Metabolismus und der Regulation der HPA-Achsen-Aktivität steht. Gene die beim Menschen gut untersucht sind und an der Ausprägung von bestimmten Merkmalen oder Krankheiten beteiligt sind, können im entsprechenden Kontext auch relevante Kandidaten für die Nutztiergenetik liefern. So wurde ein Polymorphismus im Ryanodin-Rezeptor, als eines der wesentlichen QTN für Stressanfälligkeit und Produktivität in der Schweinezucht, zuerst mit ähnlichen phänotypischen Ausprägungen beim Menschen identifiziert und charakterisiert [116,125].

3.1.1 Kandidatengen für die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse

Erst seit kurzem sind Studien beim Nutztier verfügbar, in denen Effekte von *NR3C1* auf die Stressantwort, insbesondere die HPA-Achsen-Aktivität und aggressives Verhalten, untersucht wurden [9,126]. Die Studie von Muráni *et al.* (2010) umfasste die Analyse von zehn funktionellen Kandidatengenen der HPA-Achse und ihren Zusammenhang mit Cortisolwerten und Nebennierengewichten. Dabei konnte in einer Schweinepopulation, bestehend aus kommerziellen Kreuzungstieren, die Assoziation eines Polymorphismus im 3'UTR des porcinen *NR3C1* mit beiden untersuchten Parametern der Stressantwort nachgewiesen werden. Eine der Grundvoraussetzungen für eine stabile genetische Assoziation ist die Reproduzierbarkeit der Entdeckung in anderen Populationen [127]. Daher wurde für die GWAS eine unabhängige reinrassige Schweinepopulation verwendet (siehe Abschnitt 2.2). Zudem sollten die Analysen Einblicke in die genetischen Zusammenhänge innerhalb der HPA-Achse erlauben. Für die beiden untersuchten Parameter der neuroendokrinen Stressachse konnten QTL an der Position des *NR3C1* identifiziert werden. Dabei erklärte der *NR3C1*-Locus den größten Anteil an der Variation der Cortisol-Konzentration und des Nebennierengewichts (rund 10% bzw. 30% der phänotypischen Variation) mit genomweiter Signifikanz. Vergleichbar große Auswirkungen einzelner Loci

auf die phänotypische Variation von komplexen Merkmalen sind selten [117]. Ein QTL mit ähnlich hohem Effekt führte beispielsweise zur Identifizierung einer kausalen Mutation im *IGF2*, einem bedeutenden QTN für Muskelwachstum und Fettverteilung beim Schwein [128].

3.1.2 Kandidatengen für produktive Merkmale

Der GR ist an der Regulation von grundlegenden Stoffwechselprozessen beteiligt, die zum Auf- und Abbau von Nährstoffen beitragen und die Verfügbarkeit von Ressourcen beeinflussen (siehe Abschnitt 1.1.2.3). In diesem Kontext werden Polymorphismen in kodierenden und nicht-kodierenden Bereichen des humanen *NR3C1* mit verschiedenen Stoffwechselparametern wie z.B. Fettleibigkeit, Insulin-Resistenz und Gewichtsmerkmalen in Verbindung gebracht [129,130]. Insbesondere für die Fettleibigkeit ist *NR3C1* ein etabliertes positionelles Kandidatengen beim Menschen im Zusammenhang mit Körpermasseindex (*body-mass-index*), Viszeralfett und Taille-Hüft-Verhältnis (zusammengefasst in [131]). Allerdings zeigen entsprechende Studien in Abhängigkeit von der jeweils untersuchten Kohorte divergente Ergebnisse zum Einfluss von *NR3C1* auf die Stoffwechselmerkmale [132,133]. Dabei ist bislang nicht eindeutig geklärt, ob die identifizierten Mutationen ursächlich für die Assoziationen sind, oder ein starkes Kopplungsungleichgewicht mit der kausalen Mutation vorliegt. Als gesichert gilt dagegen, dass die Fettleibigkeit ein komplexes Merkmal ist und mindestens 253 QTL-Regionen beim Menschen bekannt sind, die im Zusammenhang mit der Ausprägung der Fettleibigkeit stehen [131]. Der Abschnitt des *NR3C1*-Locus auf dem Schweinechromosom 2 ist ebenfalls mit Merkmalen des Fettansatzes assoziiert [134,135]. Zudem sind für verschiedene Schweinerassen QTL-Effekte für mehrere Parameter der Fleischqualität in dieser Region kartiert [136-140].

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Assoziationsanalysen der beiden nicht-synonymen Polymorphismen im Exon 2 des *NR3C1* ergaben in Übereinstimmung mit den genannten QTL-Studien signifikante Assoziationen mit produktiven Merkmalen (siehe Abschnitt 2.3). Assoziationsstudien von anderen relevanten Genen der HPA-Achse mit Parametern der Fleischqualität und Schlachtkörperzusammensetzung zeigen in der Regel inkonsistente Assoziationen und geringe Effekte auf produktive Merkmale [126,141]. Eine

der Ursachen dafür sind indirekte Einflüsse dieser Kandidatengene auf produktive Merkmale aufgrund ihrer Funktion innerhalb der Stressantwort. Studien belegen beispielsweise den Zusammenhang von Cortisol-Konzentrationen, die als Reaktionen auf Umweltbedingungen und Stress während der Schlachtung entstehen, mit relevanten Fleischqualitätsmerkmalen [142-144]. In dieser Hinsicht ist insbesondere die konsistente Assoziation von *NR3C1* SNP c.55G>C mit physiologisch eng verknüpften Merkmalen der Leitfähigkeit und Fleischfarbe interessant. Auch wenn die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen für die gezeigten Assoziationen der beiden N-terminal lokalisierten Aminosäuresubstitutionen nicht identifiziert werden konnten, ist *NR3C1* ein vielversprechendes positionelles und funktionelles Kandidatengen für Effekte auf Fleischqualitäts- und Schlachtkörpermerkmale beim Schwein.

3.2 Struktur des porcinen *NR3C1*

Die Struktur des GR in Säugetieren ist gut untersucht und zwischen verschiedenen Spezies weitgehend konserviert [94]. So zeigen auch die Untersuchungen zum porcinen GR eine hohe Übereinstimmung mit bisherigen Forschungsdaten. Charakteristisch für das kodierende *NR3C1* sind die hohe genetische Komplexität und die vielfältigen Mechanismen der Prozessierung und Modifikation [31]. Die genetische Vielfalt des Gens spiegelt sich auch in der SNP-Datenbank des National Institutes of Health (USA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) wider, in der insgesamt 2.623 SNP für das humane *NR3C1* verzeichnet sind. Aus GWAS geht hervor, dass ca. 47% der merkmalsassoziierten SNP im Intron oder im untranslatierten Bereich lokalisiert sind und damit den größten Anteil an der genetischen Variabilität darstellen [145,146]. Diese können, wenn auch in der Regel geringe, Effekte auf die phänotypische Variation unter anderem durch Veränderung der Genexpression haben [147,148]. Daher ist im Allgemeinen eine umfassende strukturelle Analyse essentiell, um nicht-kodierende Mutationen mit Anteil an der Variation der Merkmalsausprägung zu identifizieren. Polymorphismen im kodierenden Bereich, insbesondere nicht-synonyme Mutationen, treten dagegen deutlich seltener auf, aber tragen im Wesentlichen stärker zur Ausprägung von Merkmalen und Krankheiten bei [149,150]. Dementsprechend hatten die nicht-synonymen Polymorphismen c.39A>C,

c.55G>C und c.1829C>T des porcinen *NR3C1* das größte Potential die Rezeptorfunktion und die phänotypische Ausprägung zu beeinflussen.

Auf mRNA- und Proteinebene tragen verschiedene Mechanismen der alternativen Prozessierung wesentlich zur genetischen Diversität höherer Säugetiere bei und werden als Merkmal der Höherentwicklung angesehen [151,152]. Von den Genen des humanen Genoms werden ca. 60% alternativ gespleißt und liefern damit die Grundlage für multiple Proteinisoformen [153]. Für einige der Gene, die für Steroidhormon-Rezeptoren kodieren, sind neben mehreren Proteinisoformen auch alternative Promoterregionen und zum Teil alternativ genutzte untranslatierte Exons beschrieben [31,154-156]. Dabei scheinen die Nutzung der alternativen Promotoren und das Spleißen bestimmter Exons durch die Rekrutierung dualer Faktoren eng miteinander gekoppelt zu sein [62,157]. Die Ergebnisse dieser Dissertation bezüglich der transkriptionellen Diversität des porcinen *NR3C1* zeigen ebenfalls Hinweise auf den funktionellen Zusammenhang von strukturellen Elementen. Hierbei scheinen bestimmte Promotoren die Prozessierung bestimmter Isoformen zu begünstigen (z.B. der gezeigte Zusammenhang zwischen der Promoterregion von Exon 1D und der GR-P Isoform, siehe Abschnitt 2.4). Die im Rahmen dieser Dissertation identifizierten zehn alternativen ersten Exons und die vier mRNA-Varianten der Proteinisoformen des porcinen *NR3C1* könnten theoretisch in der Expression von 40 verschiedenen Transkriptvarianten resultieren. Unter der Annahme von zusätzlich mindestens acht alternativen Translationsstartpunkten, wie sie für das humane *NR3C1* beschrieben sind [31], könnten daraus 32 verschiedene GR-Isoformen synthetisiert werden.

3.3 Effekte der p.Ala610Val Substitution des Glucocorticoid-Rezeptors auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse

Im Rahmen dieser Dissertation konnte in Form des Aminosäureaustauschs von Alanin nach Valin an Position 610 der Polypeptidsequenz des porcinen GR (p.Ala610Val, kodiert durch c.1829C>T) eine wesentliche Komponente für die genetische Variabilität der Parameter der Stressantwort beim Schwein identifiziert werden. Zudem ist die Substitution der einzige bekannte natürliche Polymorphismus in der GR-LBD bei Säugetieren, der eine Glucocorticoid-Hypersensitivität induziert. Natürlich auftretende Polymorphismen mit ähnlichen Effekten auf den Glucocorticoid-Haushalt sind bislang nur in der NTD des GR

bzw. im nicht-kodierenden Bereich des Gens beschrieben [129,130,158]. Diese Varianten scheinen hauptsächlich die Transaktivierung zu beeinflussen und zeigen inkonsistente Effekte auf die analysierten Merkmalskomplexe (siehe Abschnitt 1.1.2.4).

Hinweise auf die funktionellen Mechanismen und physiologischen Effekte der p.Ala610Val Substitution liefert die künstlich erzeugte Substitution p.Met604Leu innerhalb der Helix 5 des humanen GR (in unmittelbarer Nachbarschaft zur porcinen p.Ala610Val Substitution) [104]. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus der ersten Studie (siehe Abschnitt 2.2) konnte durch die p.Met604Leu Substitution eine Erhöhung der transkriptionellen Aktivität *in vitro* nachgewiesen werden. In einer von Zhang *et al.* (2009) auf Grundlage der generierten Substitution erzeugten *knock-in* Mauslinie wurden zudem ähnliche Effekte auf die HPA-Achsen-Aktivität, in Form von verringerten basalen und stressinduzierten ACTH- und Corticosteroid-Konzentrationen und morphologisch veränderten Nebennieren beobachtet [159]. Zhang *et al.* fanden Hinweise darauf, dass primär die Fläche der *Zona fasciculata*, als zentrales Gewebe der Cortisolproduktion, bei den Trägern der Mutation verringert ist. Im Hinblick auf die Regulation der HPA-Achse scheint die höhere Sensitivität der Rezeptoren in Hypothalamus, Hypophyse und Hippocampus zur verstärkten negativen Rückkopplung der Stressantwort zu führen [159]. Aufgrund der Lokalisation der p.Ala610Val Substitution innerhalb der Helix 5 ist ein direkter Einfluss auf die Interaktion des Rezeptors mit dem Liganden wahrscheinlich (vergleiche Abschnitt 1.1.2.4). Das Kristallstrukturmodell der LBD des porcinen GR verdeutlicht die Rolle der mutierten Aminosäureseitenkette in der Bildung der Bindungstasche des Rezeptors (Darstellung 5). Basierend auf der Substitution der Aminosäure verringert sich der Bindungsabstand zwischen Rezeptor und Ligand in diesem Modell. Gestützt wird diese Hypothese durch Mutationsstudien des Rezeptors mit dem Ziel, die Stabilität und Löslichkeit der LBD für kristallographische Analysen zu verbessern [37]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die künstlich erzeugte Substitution von Alanin nach Valin an Position 605 des humanen GR (entspricht p.Ala610Val des porcinen GR) die van-der-Waals-Kräfte zum Liganden verstärkt und zur Stabilisierung der Proteinstruktur beiträgt.

Die Ergebnisse dieser Dissertation und die vergleichbaren Resultate aus den Studien von Zhang *et al.* (2009) deuten auf die Kompensation der erhöhten Rezeptorsensitivität durch eine verringerte Cortisol-Produktion hin. Der verringerte Bedarf an Cortisol beeinflusst zudem die Größe der Nebenniere (zum Vergleich: die chronisch erhöhte Glucocorticoid-

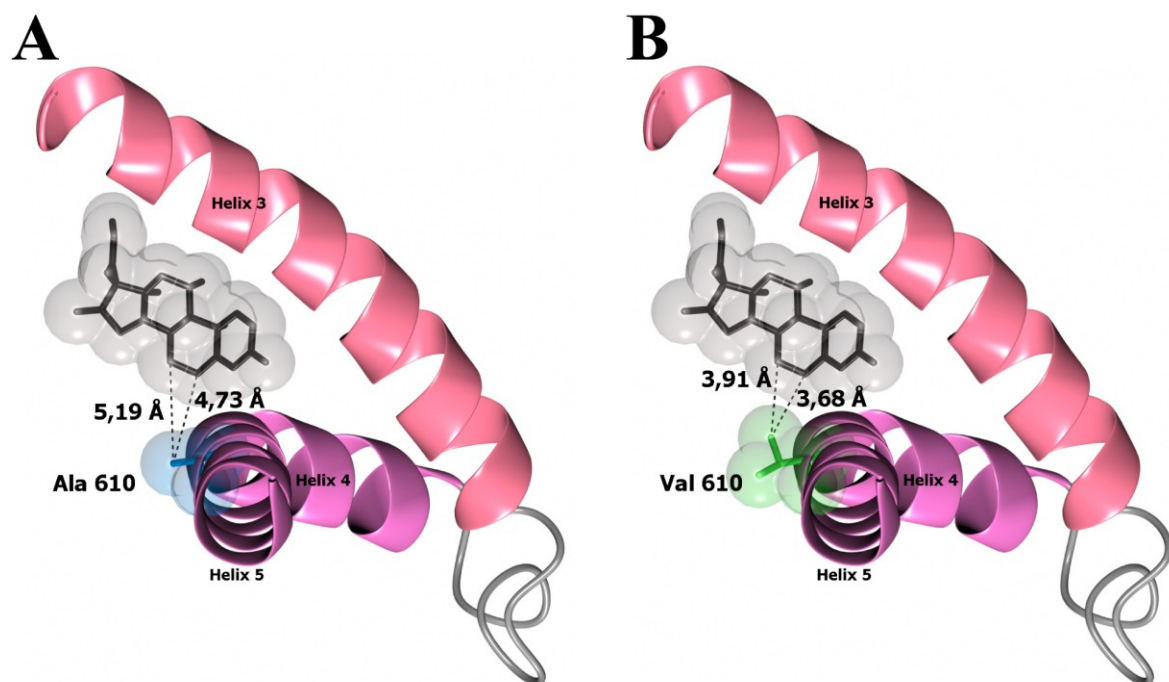
Ausschüttung führt zur Hypertrophie der Nebenniere [160,161]). Selbst unter der Annahme, dass die Effekte innerhalb der HPA-Achse kompensieren werden, sind Auswirkungen auf die akute Stressreaktion und physiologische Effekte in verschiedenen Entwicklungsstadien möglich. Speziell für den Einfluss von Glucocorticoiden in der pränatalen Entwicklung belegen zahlreiche Studien, dass die maternale Glucocorticoid-Konzentration zur fetalen Programmierung der GR-Expression beiträgt und die Corticosteroid- und ACTH-Konzentration der Nachkommen verändern kann (für verschiedene Spezies zusammengefasst in [162,163]). Pränatal mit Glucocorticoiden behandelte oder gestresste Individuen zeigen zudem Entwicklungsstörungen bestimmter Hirnareale sowie verstärktes angstbezogenes Verhalten und erhöhte Stressempfindlichkeit [164]. Ein weiterer Faktor für potentielle Effekte außerhalb der HPA-Achse ist die veränderte Ligandenbindung des GR. Neben Cortisol sind auch andere Steroide wie Progesteron und Aldosteron in der Lage, den GR zu aktivieren, wobei die Bindungsaffinität für beide Steroide etwa einem Fünftel der Affinität des GR zum Cortisol entspricht [165]. In diesem Zusammenhang zeigten eigene *in vitro* Analysen, dass die p.Ala610Val Substitution des porcinen GR die Sensitivität für die Bindung von Progesteron und Aldosteron beeinflusst (E. Muráni und H. Reyer, unveröffentlichte Daten). Im Gegensatz dazu konnten aber keine Auswirkungen auf die Steroidspezifität, z.B. für die Bindung von Testosteron, nachgewiesen werden.

Abgesehen von der veränderten Rezeptor-Ligand-Interaktion kann der niedrigere Cortisol-Spiegel, der im Zusammenhang mit der *NR3C1* c.1829C>T Substitution im Schwein auftritt, Auswirkungen auf weitere, GR-unabhängige Effekte haben. Glucocorticoide zeigen beispielsweise direkten Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften von Plasmamembranen [166,167]. Zusätzlich gibt es starke Hinweise auf nicht-genomische Effekte, die über bislang unbekannte membranständige Rezeptoren vermittelt werden und z.B. für die Modulation der Hormonausschüttung in den ersten Sekunden und Minuten nach dem Stimulus verantwortlich sind [168,169]. Diese Beispiele zeigen, dass trotz der möglichen Kompensation der Effekte innerhalb der HPA-Achse der veränderte periphere Glucocorticoid-Haushalt direkte Auswirkungen auf den Organismus haben kann.

In Bezug auf die adrenalen Steroidhormone stellt sich die Frage, ob analog zu dem transgenen Mausmodell von Zhang *et al.* die porcine *NR3C1* c.1829C>T Substitution die gesamte Nebennierenmorphologie beeinflusst oder nur Effekte auf die Cortisol-produzierende *Zona fasciculata* hat [159]. Im ersten Fall könnte sich die Mutation auch auf

die Ausschüttung weiterer Nebennierenhormone wie z.B. Aldosteron aus der *Zona glomerulosa*, Androgenen aus der *Zona reticularis* und Adrenalin aus dem Nebennierenmark auswirken.

Insgesamt bietet die identifizierte p.Ala610Val Substitution beim Schwein ein einzigartiges Modell, um die Auswirkungen der Hypersensitivität des GR und einer geringeren Cortisol-Produktion in einem natürlichen genetischen Hintergrund zu analysieren und dabei bestimmte Gewebe und Entwicklungsstadien zu fokussieren.



Darstellung 5: Auswirkungen der p.Ala610Val Substitution auf die Rezeptor-Ligand-Interaktion des porcinen Glucocorticoid-Rezeptors. Die Modellierung der Interaktion der LBD des porcinen GR mit Dexamethason erfolgte wie bereits beschrieben (siehe Darstellung 2). Die Substitution des Aminosäurerests wurde mit WinCoot Version 0.6.2 durchgeführt. Die alternative Valin-Variante (B, grün) an Position 610 der Aminosäuresequenz hat verringerte Bindungsabstände (gestrichelte Linien; Einheit = Ångström) zum Liganden im Vergleich zur Alanin-Seitenkette (A, blau).

3.4 Die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse als Selektionskriterium in der Tierzucht

Durch die Thematisierung der Stressempfindlichkeit als Kriterium für Krankheitsresistenz, Wohlbefinden, Adaptationsvermögen und Qualitätsmerkmale in der Tierproduktion rückt die Rolle der neuroendokrinen Stressachse zunehmend in den Mittelpunkt. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur gewebeabhängigen Expression alternativ prozessierter GR-Varianten und die genetische Variabilität in der Cortisol-Ausschüttung, vor allem basierend auf der p.Ala610Val Substitution, weisen Möglichkeiten auf, das komplexe Merkmal Stressantwort von der genetischen Seite zu berücksichtigen. In diesem Zusammenhang stellt sich für die Tierzucht als zentrale Frage: Sind hohe oder niedrige Cortisol-Konzentrationen erstrebenswert?

Cortisol führt unter Stressbedingungen zur Initiation von Prozessen, die der Freisetzung von Energiereserven dienen und die damit zur Verschiebung der Balance zwischen anabolen und katabolen Prozessen führen. Niedrige Cortisol-Konzentrationen begünstigen den anabolen Stoffwechsel und sind vorteilhaft für eine hohe Produktivität [170,171]. Nutztiere, die als Reaktion auf chronische Stressoren viel Cortisol produzieren, zeigen dagegen verminderte Wachstumsraten und schlechtere Futterverwertung [172-174]. Dementsprechend fördert die primäre Berücksichtigung von produktiven Merkmalen, wie z.B. dem Magerfleischanteil in der Schweinezucht, die Selektion von Tieren mit niedriger Cortisol-Ausschüttung [175].

Die Intensivhaltung domestizierter Nutztiere stellt andere Anforderungen an die Stressantwort im Vergleich zur natürlichen Umwelt wildlebender Tiere. Beispielsweise spielt die Initiation der Stressantwort zur Reaktion auf natürliche Feinde keine Rolle in der Nutztierhaltung. Dennoch liefern die positiven Effekte einer adäquaten Stressantwort und der damit verbundenen Cortisol-Ausschüttung auf die Robustheit und das Adaptationsvermögen plausible Argumente für die Berücksichtigung einer starken Reaktivität der HPA-Achse in der Tierzucht [114]. Wesentliche Faktoren im Zusammenhang mit einer adäquaten Stressreaktion sind dabei die Anpassungsfähigkeit an regionale und saisonale Umweltfaktoren und die Widerstandsfähigkeit gegen Krankheiten [176,177]. Eine Studie an Ratten hat gezeigt, dass insbesondere Individuen mit hoher Cortisol-Ausschüttung Vorteile bei der Adaptation an Hitzestress haben [178]. Auch die Überlebensrate von Ferkeln in der Schweinezucht korreliert mit Parameter einer hohen HPA-Achsen-Aktivität

[179]. Chronisch erhöhte Cortisol-Konzentrationen können dagegen zahlreiche negative Effekte auf den Organismus haben (vergleiche [120] und Abschnitt 1.1.2.3).

Insgesamt ist die Berücksichtigung der Stressantwort als Komponente der Robustheit in der Tierzucht ein wesentlicher Faktor im Hinblick auf eine nachhaltige Tierproduktion und die optimale Nutzung des genetischen Potentials unter verschiedenen Haltungs- und Umweltbedingungen [180,181]. Essentiell für die erforderliche Stressreaktion ist eine adäquate Cortisol-Ausschüttung, die schnellstmöglich zur Induktion der physiologischen Stressantwort führt und die Wiederherstellung der Homöostase ermöglicht, ohne unnötig Ressourcen zu beanspruchen.

3.5 Fazit und Ausblick

Das für den Glucocorticoid-Rezeptor kodierende Gen *NR3C1* konnte im Rahmen dieser Dissertation als ein Schlüsselgen für die genetische Variabilität der Stressantwort beim Schwein herausgestellt werden. Wesentlichen Anteil daran hat die c.1829C>T Substitution. Sowohl die Assoziationsanalysen, mit konsistenten Effekten auf die untersuchten Parameter der HPA-Achsen-Aktivität, als auch die funktionellen Analysen, mit den gezeigten Veränderungen der Rezeptorfunktion, weisen auf SNP c.1829C>T als kausale Mutation hin. Daher ist ein essentieller nächster Schritt die experimentelle Validierung der veränderten Rezeptor-Ligand-Interaktion. Glucocorticoide haben Einfluss auf vielfältige Körperfunktionen. In diesem Kontext ist ein wesentliches Ziel weiterer Studien, den Zusammenhang der Mutation mit Verhaltens-, Leistungs- und immunologischen Merkmalen beim Schwein zu analysieren. Durch die Integration dieser Daten mit Analysen zur endokrinologischen Reaktion der Träger der c.1829C>T Mutation auf definierte Stressoren, sollen grundlegende Erkenntnisse zur physiologischen Stressantwort gewonnen werden. Diese Erkenntnisse können helfen, die potentielle Berücksichtigung von *NR3C1* als Marker der HPA-Achsen-Aktivität und des produktiven Adaptationsvermögens in der Schweinezucht zu bewerten.

Weiterhin unterstreichen die Assoziationsanalysen der zwei Polymorphismen in der N-terminalen Domäne des porcinen GR mit Schlachtkörper- und Fleischqualitätsmerkmalen die Rolle von *NR3C1* als Kandidatengen für produktive Merkmale. Hierbei gilt es auf Merkmalsebene primär die gezeigten Assoziationen in anderen Schweinepopulationen zu

bestätigen. Weitere Analysen der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sollen dazu beitragen, die Zusammenhänge zwischen genetischen Variationen von *NR3C1* und Effekten auf produktive Merkmale zu ergründen und die Rolle des GR in der Regulation der Energiebalance zu verdeutlichen.

Die Analysen der alternativen Transkriptvarianten und Proteinisoformen des porcinen *NR3C1* lieferten interessante Erkenntnisse zur potentiellen Regulation der zahlreichen Funktionen des GR. Insbesondere die gewebespezifische Expression bestimmter Transkripte und die Korrelation mit dem Auftreten funktionell divergenter Isoformen bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen. Die strukturelle Analyse der Promoterregion der individuellen ersten Exons könnte dazu beitragen, spezifische Mechanismen zu identifizieren, welche die Expression in bestimmten Geweben fördern. Beispielsweise könnten regulatorische Polymorphismen in der Promoterregion potentielle Auswirkungen auf die gewebespezifische Expression von *NR3C1* haben und damit das ganzheitliche Funktionsspektrum des Rezeptors beeinflussen.

Die Thematisierung des komplexen Merkmals der Stressantwort gewinnt zunehmend an Bedeutung in der Tierzucht um die produktive Adaptationsfähigkeit der Tiere unter Ausnutzung des genetischen Potentials in einer nachhaltigen Tierzucht sicherzustellen. Schweine zeigen eine hohe interindividuelle Variabilität in der Stressantwort, die eine starke genetische Komponente besitzt. Insbesondere Polymorphismen innerhalb von Genen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse, als zentrales neuroendokrines System zur Kontrolle der Stressreaktion, stellen eine mögliche Ursache für die beobachtete Variabilität dar. In diesem Kontext war das zentrale Thema dieser Dissertation das Schlüsselgen *NR3C1*, dessen Genprodukt, der Glucocorticoid-Rezeptor (GR), wesentlichen Anteil an der Vermittlung der physiologischen Stressantwort und der negativen Rückkopplung der HPA-Achse hat. Dabei wurde, ausgehend von der strukturellen Analyse des porcinen *NR3C1*, das Ziel verfolgt den Einfluss von Genvarianten auf die Aktivität der neuroendokrinen Stressantwort darzustellen und die Relevanz des Gens als Marker für die Tierzucht zu bewerten.

Die genomweiten Assoziationsstudien verdeutlichten und bestätigten den hohen Anteil des porcinen *NR3C1*-Locus an der Variation der Parameter der HPA-Achsen-Aktivität mit genomweiter Signifikanz. Zur Identifizierung der dafür ursächlichen Polymorphismen und zur Erfassung der transkriptionellen Diversität wurde die kodierende Region des porcinen *NR3C1* im Weiteren detailliert analysiert. Dabei konnten drei nicht-synonyme Polymorphismen (c.39A>C, c.55G>C und c.1829C>T) sowie Transkriptvarianten von zehn untranslatierten ersten Exons (1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 1H₂ und 1J) und vier GR-Isoformen (GR-alpha, GR-beta, GR-P und GR-gamma) nachgewiesen werden.

Für die identifizierten Transkriptvarianten wurden Expressionsprofile der neun wichtigsten Zielgewebe von Glucocorticoiden angefertigt. Die Resultate implizierten, dass die gewebe-spezifische Diversität der GR-Varianten auf der Nutzung alternativer Promotoren und der damit verbundenen Prozessierung favorisierter GR-Isoformen basiert. Interessant in Bezug auf die Funktion des Rezeptors innerhalb der Stressantwort war vor allem die Korrelation zwischen der Nutzung von Exon 1D und dem Auftreten der GR-P Spleißvariante in neuroendokrinen Geweben. Für nachfolgende Studien bleibt zu klären, wie insbesondere

die schwächer exprimierten Varianten die Diversität beeinflussen und welche Rolle Entwicklungsstadien und Stresssituationen auf die Expressionsprofile einzelner Transkriptvarianten haben.

Die identifizierten Substitutionen c.39A>C (p.Glu13Asp) und c.55G>C (p.Val19Leu) liegen in der N-terminalen Domäne des GR, welche wesentlich an der Transaktivierung von Zielgenen beteiligt ist. Beide Polymorphismen zeigten keine oder inkonsistente Assoziation mit Parametern der HPA-Achsen-Aktivität. Dagegen verdeutlichten unsere Studien, dass beide Polymorphismen signifikant mit Effekten auf Fleischqualitäts- und Schlachtkörpermerkmalen assoziiert sind. Die ermittelten Effekte waren konsistent in Bezug auf den physiologischen Zusammenhang zwischen den Merkmalen und werden sowohl durch QTL-Kartierungen beim Schwein als auch durch Analysen von N-terminalen GR-Polymorphismen bei anderen Spezies gestützt.

Den wesentlichen Anteil an der genetischen Variabilität der HPA-Achsen-Aktivität konnte dem SNP c.1829C>T, der zur p.Ala610Val Substitution in der Ligandenbindungsdomäne des GR führt, zugesprochen werden. Die Substitution zeigte deutliche und hoch signifikante negative Effekte auf Cortisolwerte und Nebennierengewichte und konnte in allen drei untersuchten Schweinepopulationen reproduziert werden. Die experimentellen und *in silico* durchgeführten Analysen zu den molekularen Mechanismen der Substitution deuteten auf eine veränderte Rezeptor-Ligand-Interaktion hin. Damit ist dieser SNP die erste genetische Variante beim Schwein für die ein kausaler Zusammenhang zur Aktivität der HPA-Achse aufgezeigt werden konnte und vertieft grundlegend den Kenntnisstand über das komplexe Merkmal der Stressantwort beim Schwein.

Die dargestellten Studien zum *NR3C1* liefern aufgrund des kausalen Zusammenhangs zur Aktivität der neuroendokrinen Stressachse und den vielversprechenden Assoziationen mit produktiven Merkmalen überzeugende Argumente für eine Berücksichtigung von *NR3C1* in der molekularen Tierzucht. Weitere Analysen sollten daher insbesondere die umfassende Charakterisierung der Effekte der Polymorphismen auf züchterisch relevante Parameter, z.B. der Immunantwort, des Verhaltens und der Produktivität, forcieren.

Literaturverzeichnis



1. Vegiopoulos A, Herzig S (2007) Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol* 275: 43-61.
2. Mormede P, Andanson S, Auperin B, Beerda B, Guemene D, et al. (2007) Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol Behav* 92: 317-339.
3. Redei EE (2008) Molecular genetics of the stress-responsive adrenocortical axis. *Ann Med* 40: 139-148.
4. Hayes B, Goddard ME (2001) The distribution of the effects of genes affecting quantitative traits in livestock. *Genet Sel Evol* 33: 209-230.
5. Sutherland MA, Niekamp SR, Johnson RW, Van Alstine WG, Salak-Johnson JL (2007) Heat and social rank impact behavior and physiology of PRRS-virus-infected pigs. *Physiol Behav* 90: 73-81.
6. Von Borell E (2001) The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. *J Anim Sci* 79: E260-E267.
7. Kick AR, Tompkins MB, Flowers WL, Whisnant CS, Almond GW (2012) Effects of stress associated with weaning on the adaptive immune system in pigs. *J Anim Sci* 90: 649-656.
8. Barbut S, Sosnicki AA, Lonergan SM, Knapp T, Ciobanu DC, et al. (2008) Progress in reducing the pale, soft and exudative (PSE) problem in pork and poultry meat. *Meat Sci* 79: 46-63.
9. Muráni E, Ponsuksili S, D'Eath RB, Turner SP, Kurt E, et al. (2010) Association of HPA axis-related genetic variation with stress reactivity and aggressive behaviour in pigs. *BMC Genet* 11: 74.
10. Elverson CA, Wilson ME (2005) Cortisol: circadian rhythm and response to a stressor. *Newborn Infant Nurs Rev* 5: 159-169.
11. de Kloet ER, Joels M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6: 463-475.

12. Kitchener P, Di Blasi F, Borrelli E, Piazza PV (2004) Differences between brain structures in nuclear translocation and DNA binding of the glucocorticoid receptor during stress and the circadian cycle. *Eur J Neurosci* 19: 1837-1846.
13. Tasker JG, Herman JP (2011) Mechanisms of rapid glucocorticoid feedback inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress* 14: 398-406.
14. Drouin J, Trifiro MA, Plante RK, Nemer M, Eriksson P, et al. (1989) Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent repression of pro-opiomelanocortin gene transcription. *Mol Cell Biol* 9: 5305-5314.
15. Tsigos C, Chrousos GP (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 53: 865-871.
16. Valdar W, Solberg LC, Gauguier D, Cookson WO, Rawlins JNP, et al. (2006) Genetic and environmental effects on complex traits in mice. *Genetics* 174: 959-984.
17. Badr F (1976) Selection for high and low adrenal weight in mice. *J Endocrinol* 70: 457-463.
18. Larzul C, Foury A, Terenina E, Billon Y, Mormede P. Genetic parameters for ACTH response in pig. In: 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (Hrsg. German Society for Animal Science); 1.-6. August 2010; Leipzig, Deutschland.
19. Kadarmideen HN, Janss LL (2007) Population and systems genetics analyses of cortisol in pigs divergently selected for stress. *Physiol Genomics* 29: 57-65.
20. Albert FW, Shchepina O, Winter C, Römpker H, Teupser D, et al. (2008) Phenotypic differences in behavior, physiology and neurochemistry between rats selected for tameness and for defensive aggression towards humans. *Horm Behav* 53: 413-421.
21. Kunzl C, Sachser N (1999) The behavioral endocrinology of domestication: A comparison between the domestic guinea pig (*Cavia aperea* f. *porcellus*) and its wild ancestor, the cavy (*Cavia aperea*). *Horm Behav* 35: 28-37.
22. Trut L, Oskina I, Kharlamova A (2009) Animal evolution during domestication: the domesticated fox as a model. *Bioessays* 31: 349-360.
23. Weiler U, Claus R, Schnoebelen-Combes S, Louveau I (1998) Influence of age and genotype on endocrine parameters and growth performance: a comparative study in Wild boars, Meishan and Large White boars. *Livest Prod Sci* 54: 21-31.

24. Garlow SJ, Boone E, Li W, Owens MJ, Nemeroff CB (2005) Genetic analysis of the hypothalamic corticotropin-releasing factor system. *Endocrinology* 146: 2362-2368.
25. Rhen T, Cidlowski JA (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids – new mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine* 353: 1711-1723.
26. Kuzmuk KN, Schook LB (2011) Pigs as a model for biomedical sciences. In: Rothschild MF, Ruvinsky A (Hrsg.). *The genetics of the pig*. Wallingford: CABI. pp. 426-444.
27. Lunney JK (2007) Advances in swine biomedical model genomics. *Int J Biol Sci* 3: 179-184.
28. Bockmühl Y, Murgatroyd CA, Kuczynska A, Adcock IM, Almeida OF, et al. (2011) Differential regulation and function of 5'-untranslated GR-exon 1 transcripts. *Mol Endocrinol*: 1100-1110.
29. McCormick JA, Lyons V, Jacobson MD, Noble J, Diorio J, et al. (2000) 5'-heterogeneity of glucocorticoid receptor messenger RNA is tissue specific: differential regulation of variant transcripts by early-life events. *Mol Endocrinol* 14: 506-517.
30. Presul E, Schmidt S, Kofler R, Helmberg A (2007) Identification, tissue expression, and glucocorticoid responsiveness of alternative first exons of the human glucocorticoid receptor. *J Mol Endocrinol* 38: 79-90.
31. Gross KL, Lu NZ, Cidlowski JA (2009) Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance. *Mol Cell Endocrinol* 300: 7-16.
32. Russcher H, Dalm VA, de Jong FH, Brinkmann AO, Hofland LJ, et al. (2007) Associations between promoter usage and alternative splicing of the glucocorticoid receptor gene. *J Mol Endocrinol* 38: 91-98.
33. Turner JD, Muller CP (2005) Structure of the glucocorticoid receptor (NR3C1) gene 5' untranslated region: identification, and tissue distribution of multiple new human exon 1. *J Mol Endocrinol* 35: 283-292.
34. Kumar R, Thompson EB (2003) Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol Endocrinol* 17: 1-10.
35. Bledsoe RK, Stewart EL, Pearce KH (2004) Structure and function of the glucocorticoid receptor ligand binding domain. *Vitam Horm* 68: 49-91.

36. Luisi B, Xu W, Otwinowski Z, Freedman L, Yamamoto K, et al. (1991) Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352: 497-505.
37. Seitz T, Thoma R, Schoch GA, Stihle M, Benz J, et al. (2010) Enhancing the stability and solubility of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain by high-throughput library screening. *J Mol Biol* 403: 562-577.
38. McNicholas S, Potterton E, Wilson KS, Noble MEM (2011) Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallogr D* 67: 386-394.
39. Helsen C, Kerkhofs S, Clinckemalie L, Spans L, Laurent M, et al. (2012) Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. *Mol Cell Endocrinol* 348: 411-417.
40. Strähle U, Klock G, Schütz G (1987) DNA sequence of 15 base pairs is sufficient to mediate both glucocorticoid and progesterone induction of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7871-7875.
41. Lonard DM, O'Malley BW (2007) Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Mol Cell* 27: 691-700.
42. Surjit M, Ganti KP, Mukherji A, Ye T, Hua G, et al. (2011) Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell* 145: 224-241.
43. Imai E, Miner JN, Mitchell JA, Yamamoto KR, Granner DK (1993) Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids. *J Biol Chem* 268: 5353-5356.
44. Kassel O, Herrlich P (2007) Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: Molecular aspects. *Mol Cell Endocrinol* 275: 13-29.
45. Wang J-C, Derynck MK, Nonaka DF, Khodabakhsh DB, Haqq C, et al. (2004) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) scanning identifies primary glucocorticoid receptor target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15603-15608.
46. Ponsuksili S, Du Y, Muráni E, Schwerin M, Wimmers K (2012) Elucidating molecular networks that either affect or respond to plasma cortisol concentration in target tissues of liver and muscle. *Genetics* 192: 1109-1122.

47. Moutsatsou P, Kassi E, Papavassiliou AG (2012) Glucocorticoid receptor signaling in bone cells. *Trends Mol Med* 18: 348-359.
48. Lewis JG, Bagley CJ, Elder PA, Bachmann AW, Torpy DJ (2005) Plasma free cortisol fraction reflects levels of functioning corticosteroid-binding globulin. *Clin Chim Acta* 359: 189-194.
49. De Bosscher K, Haegeman G (2009) Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 23: 281-291.
50. Czock D, Keller F, Rasche FM, Haussler U (2005) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet* 44: 61-98.
51. Kuo T, Harris CA, Wang JC (2013) Metabolic functions of glucocorticoid receptor in skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol* 380: 79-88.
52. Ma K, Mallidis C, Artaza J, Taylor W, Gonzalez-Cadavid N, et al. (2001) Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E1128-1136.
53. Gilson H, Schakman O, Combaret L, Lause P, Grobet L, et al. (2007) Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology* 148: 452-460.
54. Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, et al. (2011) Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell Metabolism* 13: 170-182.
55. Li X, Yang X, Shan B, Shi J, Xia D, et al. (2009) Meat quality is associated with muscle metabolic status but not contractile myofiber type composition in premature pigs. *Meat Sci* 81: 218-223.
56. Manoli I, Le H, Alesci S, McFann KK, Su YA, et al. (2005) Monoamine oxidase-A is a major target gene for glucocorticoids in human skeletal muscle cells. *FASEB J* 19: 1359-1361.
57. Combaret L, Taillandier D, Dardevet D, Béchet D, Rallièrre C, et al. (2004) Glucocorticoids regulate mRNA levels for subunits of the 19 S regulatory complex of the 26 S proteasome in fast-twitch skeletal muscles. *Biochem J* 378: 239-246.
58. Pereira R, Carvalho JFd, Canalis E (2010) Glucocorticoid-induced osteoporosis in rheumatic diseases. *Clinics (Sao Paulo)* 65: 1197-1205.

59. Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K (2002) Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 96: 23-43.
60. Koliwad SK, Kuo T, Shipp LE, Gray NE, Backhed F, et al. (2009) Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4, fasting-induced adipose factor) is a direct glucocorticoid receptor target and participates in glucocorticoid-regulated triglyceride metabolism. *J Biol Chem* 284: 25593-25601.
61. Peckett AJ, Wright DC, Riddell MC (2011) The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism* 60: 1500-1510.
62. Huang Y, Li W, Yao X, Lin Q-j, Yin J-w, et al. (2012) Mediator complex regulates alternative mRNA processing via the MED23 subunit. *Mol Cell* 45: 459-469.
63. Yu C-Y, Mayba O, Lee JV, Tran J, Harris C, et al. (2010) Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor binding regions in adipocytes reveal gene network involved in triglyceride homeostasis. *PloS one* 5: e15188.
64. Tronche F, Opherck C, Moriggl R, Kellendonk C, Reimann A, et al. (2004) Glucocorticoid receptor function in hepatocytes is essential to promote postnatal body growth. *Genes Dev* 18: 492-497.
65. Wong S, Tan K, Carey KT, Fukushima A, Tiganis T, et al. (2010) Glucocorticoids stimulate hepatic and renal catecholamine inactivation by direct rapid induction of the dopamine sulfotransferase *Sult1d1*. *Endocrinology* 151: 185-194.
66. Reddy AB, Maywood ES, Karp NA, King VM, Inoue Y, et al. (2007) Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome. *Hepatology* 45: 1478-1488.
67. Seibel MJ, Cooper MS, Zhou H (2013) Glucocorticoid-induced osteoporosis: mechanisms, management, and future perspectives. *Lancet Diabetes Endocrinol* 1: 59-70.
68. Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian J (2007) Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporosis Int* 18: 1319-1328.
69. Rauch A, Seitz S, Baschant U, Schilling AF, Illing A, et al. (2010) Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor. *Cell metabolism* 11: 517-531.
70. Hodel A (2001) Effects of glucocorticoids on adrenal chromaffin cells. *J Neuroendocrinol* 13: 216-220.

71. Zha Q, Wang Y, Fan Y, Zhu M-Y (2011) Dexamethasone-induced up-regulation of the human norepinephrine transporter involves the glucocorticoid receptor and increased binding of C/EBP- β to the proximal promoter of norepinephrine transporter. *J Neurochem* 119: 654-663.
72. Hagerty T, Morgan W, Elango N, Strong R (2001) Identification of a glucocorticoid-responsive element in the promoter region of the mouse tyrosine hydroxylase gene. *J Neurochem* 76: 825-834.
73. Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, et al. (1998) DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93: 531-541.
74. Lansang MC, Hustak LK (2011) Glucocorticoid-induced diabetes and adrenal suppression: How to detect and manage them. *Cleve Clin J Med* 78: 748-756.
75. Beaulieu E, Morand EF (2011) Role of GILZ in immune regulation, glucocorticoid actions and rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7: 340-348.
76. Radoja N, Komine M, Jho SH, Blumenberg M, Tomic-Canic M (2000) Novel mechanism of steroid action in skin through glucocorticoid receptor monomers. *Mol Cell Biol* 20: 4328-4339.
77. Clark AR (2007) Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol Cell Endocrinol* 275: 79-97.
78. Chen L, Finnerty C, Gustafson WC, Bush CR, Chi P, et al. (2003) Genomic analysis of glucocorticoid-regulated promoters in murine T-lymphoma cells. *Recent Prog Horm Res* 58: 155-174.
79. Barnes P (2001) Molecular mechanisms of corticosteroids in allergic diseases. *Allergy* 56: 928-936.
80. Newton R, Holden NS (2007) Separating transrepression and transactivation: a distressing divorce for the glucocorticoid receptor? *Mol Pharmacol* 72: 799-809.
81. Godbout JP, Glaser R (2006) Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. *J Neuroimmune Pharm* 1: 421-427.
82. Ostwald D, Karpac J, Hochgeschwender U (2006) Effects on hippocampus of lifelong absence of glucocorticoids in the pro-opiomelanocortin null mutant mouse reveal complex relationship between glucocorticoids and hippocampal structure and function. *J Mol Neurosci* 28: 291-302.

83. de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19: 269-301.
84. Nichols NR, Agolley D, Zieba M, Bye N (2005) Glucocorticoid regulation of glial responses during hippocampal neurodegeneration and regeneration. *Brain Res Rev* 48: 287-301.
85. Carter BS, Hamilton DE, Thompson RC (2013) Acute and chronic glucocorticoid treatments regulate astrocyte-enriched mRNAs in multiple brain regions in vivo. *Front Neurosci* 7, DOI: 10.3389/fnins.2013.00139.
86. Polman JAE, Hunter RG, Speksnijder N, van den Oever JM, Korobko OB, et al. (2012) Glucocorticoids modulate the mTOR pathway in the hippocampus: differential effects depending on stress history. *Endocrinology* 153: 4317-4327.
87. Datson NA, Morsink MC, Meijer OC, de Kloet ER (2008) Central corticosteroid actions: Search for gene targets. *Eur J Pharmacol* 583: 272-289.
88. Sato H, Horikawa Y, Iizuka K, Sakurai N, Tanaka T, et al. (2008) Large-scale analysis of glucocorticoid target genes in rat hypothalamus. *J Neurochem* 106: 805-814.
89. Cerqueira JJ, Mailliet F, Almeida OF, Jay TM, Sousa N (2007) The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *J Neurosci* 27: 2781-2787.
90. Sakai DD, Helms S, Carlstedt-Duke J, Gustafsson J-A, Rottman FM, et al. (1988) Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes Dev* 2: 1144-1154.
91. Vreugdenhil E, de Kloet ER, Schaaf M, Datson NA (2001) Genetic dissection of corticosterone receptor function in the rat hippocampus. *Eur Neuropsychopharmacol* 11: 423-430.
92. Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S (2009) Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* 10: 423-433.
93. Zhang Z, Burch PE, Cooney AJ, Lanz RB, Pereira FA, et al. (2004) Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. *Genome Res* 14: 580-590.
94. Stolte EH, van Kemenade BMLV, Savelkoul HFJ, Flik G (2006) Evolution of glucocorticoid receptors with different glucocorticoid sensitivity. *J Endocrinol* 190: 17-28.

95. Hollenberg SM, Evans RM (1988) Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 55: 899-906.
96. Kumar R, Thompson EB (2010) Influence of flanking sequences on signaling between the activation function AF1 and DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor. *Arch Biochem Biophys* 496: 140-145.
97. Russcher H, Smit P, van den Akker EL, van Rossum EF, Brinkmann AO, et al. (2005) Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 5804-5810.
98. Huizenga NATM, Koper JW, de Lange P, Pols HAP, Stolk RP, et al. (1998) A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with an increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 144-151.
99. van Rossum EFC, Koper JW, Huizenga NATM, Uitterlinden AG, Janssen JAMJL, et al. (2002) A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes* 51: 3128-3134.
100. Ruiz M, Lind U, Gåfvels M, Eggertsen G, Carlstedt-Duke J, et al. (2001) Characterization of two novel mutations in the glucocorticoid receptor gene in patients with primary cortisol resistance. *Clin Endocrinol (Oxf)* 55: 363-371.
101. Roberts ML, Kino T, Nicolaides NC, Hurt DE, Katsantoni E, et al. (2013) A novel point mutation in the DNA-binding domain (DBD) of the human glucocorticoid receptor causes primary generalized glucocorticoid resistance by disrupting the hydrophobic structure of its DBD. *J Clin Endocrinol Metab* 98: E790-E795.
102. Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, Delves CJ, Apolito CJ, et al. (2002) Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* 110: 93-105.
103. Hurley DM, Accili D, Stratakis C, Karl M, Vamvakopoulos N, et al. (1991) Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. *J Clin Invest* 87: 680-686.

104. Zhang J, Simisky J, Tsai FT, Geller DS (2005) A critical role of helix 3-helix 5 interaction in steroid hormone receptor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 2707-2712.
105. Brufsky A, Malchoff D, Javier E, Reardon G, Rowe D, et al. (1990) A glucocorticoid receptor mutation in a subject with primary cortisol resistance. *Trans Assoc Am Physicians* 103: 53-63.
106. Vottero A, Kino T, Combe H, Lecomte P, Chrousos GP (2002) A novel, C-terminal dominant negative mutation of the GR causes familial glucocorticoid resistance through abnormal interactions with p160 steroid receptor coactivators. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2658-2667.
107. Mendonca BB, Leite MV, de Castro M, Kino T, Elias LLK, et al. (2002) Female pseudohermaphroditism caused by a novel homozygous missense mutation of the GR gene. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1805-1809.
108. Kunz S, Sandoval R, Carlsson P, Carlstedt-Duke J, Bloom JW, et al. (2003) Identification of a novel glucocorticoid receptor mutation in budesonide-resistant human bronchial epithelial cells. *Mol Endocrinol* 17: 2566-2582.
109. Bray PJ, Cotton RGH (2003) Variations of the human glucocorticoid receptor gene (NR3C1): pathological and in vitro mutations and polymorphisms. *Hum Mutat* 21: 557-568.
110. Kouba M, Hermier D, Le Dividich J (2001) Influence of a high ambient temperature on lipid metabolism in the growing pig. *J Anim Sci* 79: 81-87.
111. White HM, Richert BT, Schinckel AP, Burgess JR, Donkin SS, et al. (2008) Effects of temperature stress on growth performance and bacon quality in grow-finish pigs housed at two densities. *J Anim Sci* 86: 1789-1798.
112. Scheffler TL, Gerrard DE (2007) Mechanisms controlling pork quality development: The biochemistry controlling postmortem energy metabolism. *Meat Sci* 77: 7-16.
113. Terlouw C (2005) Stress reactions at slaughter and meat quality in pigs: genetic background and prior experience - A brief review of recent findings. *Livest Prod Sci* 94: 125-135.
114. Mormede P, Foury A, Terenina E, Knap PW (2011) Breeding for robustness: the role of cortisol. *Animal* 5: 651-657.

115. Moberg GP (2000) Biological response to stress: implications for animal welfare. In: Moberg GP, Mench, JA (Hrsg.). The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare. Wallingford: CABI. pp. 1-21.
116. Fujii J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna VK, et al. (1991) Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253: 448-451.
117. Andersson L, Georges M (2004) Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. *Nat Rev Genet* 5: 202-212.
118. Mitchell G, Heffron JJA (1982) Porcine stress syndromes. *Adv Food Res* 28: 167-230.
119. Davoli R, Braglia S (2007) Molecular approaches in pig breeding to improve meat quality. *Brief Funct Genomic Proteomic* 6: 313-321.
120. Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE (1993) Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* 119: 1198-1208.
121. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, et al. (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318: 635.
122. Orlovsky MA (2012) Allelic polymorphism of glucocorticoid receptor NR3C1 (GR): from molecular biology to clinical implications. *Biopolym Cell* 28: 338-351.
123. Chrousos GP (2009) Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol* 5: 374-381.
124. Holsboer F, Ising M (2010) Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy. *Annu Rev Psychol* 61: 81-109.
125. MacLennan DH, Duff C, Zorzato F, Fujii J, Phillips M, et al. (1990) Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. *Nature* 343: 559-561.
126. Terenina E, Babigumira B, Le Mignon G, Bazovkina D, Rousseau S, et al. (2013) Association study of molecular polymorphisms in candidate genes related to stress responses with production and meat quality traits in pigs. *Domest Anim Endocrinol* 44: 81-97.

127. Pearson TA, Manolio TA (2008) How to interpret a genome-wide association study. *J Am Med Assoc* 299: 1335-1344.
128. Van Laere A-S, Nguyen M, Braunschweig M, Nezer C, Collette C, et al. (2003) A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature* 425: 832-836.
129. Lin RCY, Wang XL, Dalziel B, Caterson ID, Morris BJ (2003) Association of obesity, but not diabetes or hypertension, with glucocorticoid receptor N363S variant. *Obesity Res* 11: 802-808.
130. Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, Chagnon M, Pérusse L, et al. (2000) A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Obesity Res* 8: 211-218.
131. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, et al. (2006) The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity* 14: 529-644.
132. Rosmond R (2003) Association studies of genetic polymorphisms in central obesity: a critical review. *Int J Obesity* 27: 1141-1151.
133. Morris BJ, Lin RCY, Wang XL, Dalziel B, Caterson ID (2003) Response: central obesity is associated with glucocorticoid receptor N363S variant: big picture sheds light. *Obesity Res* 11: 1607-1609.
134. Nowacka-Woszek J, Szczerbal I, Fijak-Nowak H, Switonski M (2008) Chromosomal localization of 13 candidate genes for human obesity in the pig genome. *J Appl Genet* 49: 373-377.
135. Liu G, Jennen DG, Tholen E, Juengst H, Kleinwachter T, et al. (2007) A genome scan reveals QTL for growth, fatness, leanness and meat quality in a Duroc-Pietrain resource population. *Anim Genet* 38: 241-252.
136. Malek M, Dekkers JC, Lee HK, Baas TJ, Prusa K, et al. (2001) A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition. *Mamm Genome* 12: 637-645.
137. van Wijk HJ, Dibbitts B, Baron EE, Brings AD, Harlizius B, et al. (2006) Identification of quantitative trait loci for carcass composition and pork quality traits in a commercial finishing cross. *J Anim Sci* 84: 789-799.

138. Heuven HC, van Wijk RH, Dibbits B, van Kampen TA, Knol EF, et al. (2009) Mapping carcass and meat quality QTL on *Sus Scrofa* chromosome 2 in commercial finishing pigs. *Genet Sel Evol* 41: 4.
139. Rohrer GA, Thallman RM, Shackelford S, Wheeler T, Koohmaraie M (2006) A genome scan for loci affecting pork quality in a Duroc-Landrace F population. *Anim Genet* 37: 17-27.
140. Harmegnies N, Davin F, De Smet S, Buys N, Georges M, et al. (2006) Results of a whole-genome quantitative trait locus scan for growth, carcass composition and meat quality in a porcine four-way cross. *Anim Genet* 37: 543-553.
141. Muráni E, Ponsuksili S, Schellander K, Wimmers K (2006) Association of corticotropin-releasing hormone gene variation with performance and meat quality traits in commercial pig lines. *Anim Genet* 37: 509-512.
142. Choi YM, Jung KC, Choe JH, Kim BC (2012) Effects of muscle cortisol concentration on muscle fiber characteristics, pork quality, and sensory quality of cooked pork. *Meat Sci* 91: 490-498.
143. Skrlep M, Prevolnik M, Segula B, Candek-Potokar M (2009) Association of plasma stress markers at slaughter with carcass or meat quality in pigs. *Slov Vet Zb* 46: 133-142.
144. Foury A, Devillers N, Sanchez MP, Griffon H, Le Roy P, et al. (2005) Stress hormones, carcass composition and meat quality in Large White x Duroc pigs. *Meat Sci* 69: 703-707.
145. Consortium TGP (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467: 1061-1073.
146. Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, et al. (2009) Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 9362-9367.
147. Ernst CW, Steibel JP (2013) Molecular advances in QTL discovery and application in pig breeding. *Trends Genet* 29: 215-224.
148. Smith AJ, Howard P, Shah S, Eriksson P, Stender S, et al. (2012) Use of allele-specific FAIRE to determine functional regulatory polymorphism using large-scale genotyping arrays. *PLoS Genet* 8: e1002908.

149. Ng PC, Henikoff S (2006) Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7: 61-80.
150. Zhao Z, Fu Y-X, Hewett-Emmett D, Boerwinkle E (2003) Investigating single nucleotide polymorphism (SNP) density in the human genome and its implications for molecular evolution. *Gene* 312: 207-213.
151. Boue S, Letunic I, Bork P (2003) Alternative splicing and evolution. *Bioessays* 25: 1031-1034.
152. Patthy L (1999) Genome evolution and the evolution of exon-shuffling-a review. *Gene* 238: 103-114.
153. Auboeuf D, Honig A, Berget SM, O'Malley BW (2002) Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. *Sci Signal* 298: 416-419.
154. Flouriot G, Griffin C, Kenealy M, Sonntag-Buck V, Gannon F (1998) Differentially expressed messenger RNA isoforms of the human estrogen receptor-alpha gene are generated by alternative splicing and promoter usage. *Mol Endocrinol* 12: 1939-1954.
155. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, et al. (1990) Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 9: 1603-1614.
156. Kwak SP, Patel PD, Thompson RC, Akil H, Watson SJ (1993) 5'-Heterogeneity of the mineralocorticoid receptor messenger ribonucleic acid: differential expression and regulation of splice variants within the rat hippocampus. *Endocrinology* 133: 2344-2350.
157. Cramer P, Pesce CG, Baralle FE, Kornblihtt AR (1997) Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11456-11460.
158. van Rossum EF, Lamberts SW (2004) Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res* 59: 333-357.
159. Zhang JH, Ge RS, Matte-Martone C, Goodwin J, Shlomchik WD, et al. (2009) Characterization of a novel gain of function glucocorticoid receptor knock-in mouse. *J Biol Chem* 284: 6249-6259.

160. Nemeroff CB, Krishnan KR, Reed D, Leder R, Beam C, et al. (1992) Adrenal gland enlargement in major depression. A computed tomographic study. *Arch Gen Psychiatry* 49: 384-387.
161. Dedic N, Touma C, Romanowski C, Schieven M, Kühne C, et al. (2012) Assessing behavioural effects of chronic HPA axis activation using conditional CRH-overexpressing Mice. *Cell Mol Neurobiol* 32: 815-828.
162. Kapoor A, Dunn E, Kostaki A, Andrews MH, Matthews SG (2006) Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J Physiol (Lond)* 572: 31-44.
163. Harris A, Seckl J (2011) Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Horm Behav* 59: 279-289.
164. Weinstock M (2008) The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev* 32: 1073-1086.
165. von Langen J, Fritzemeier KH, Diekmann S, Hillisch A (2005) Molecular basis of the interaction specificity between the human glucocorticoid receptor and its endogenous steroid ligand cortisol. *ChemBioChem* 6: 1110-1118.
166. Dindia L, Murray J, Faught E, Davis TL, Leonenko Z, et al. (2012) Novel nongenomic signaling by glucocorticoid may involve changes to liver membrane order in rainbow trout. *PLoS One* 7: e46859.
167. Buttgereit F, Wehling M, Burmester G-R (1998) A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: Steroid treatment of rheumatic diseases revisited. *Arthritis Rheum* 41: 761-767.
168. Lösel R, Wehling M (2003) Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 46-56.
169. Borski RJ (2000) Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. *Trends Endocrinol Metab* 11: 427-436.
170. Menconi M, Fareed M, O'Neal P, Poylin V, Wei WEI, et al. (2007) Role of glucocorticoids in the molecular regulation of muscle wasting. *Crit Care Med* 35: S602-S608.
171. Schakman O, Gilson H, Thissen JP (2008) Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol* 197: 1-10.

172. Hennessy DP, Stelmasiak T, Johnston NE, Jackson PN, Outch KH (1988) Consistent capacity for adrenocortical-response to Acth administration in pigs. *Am J Vet Res* 49: 1276-1283.
173. Hemsworth PH, Barnett JL, Hansen C (1981) The influence of handling by humans on the behavior, growth, and corticosteroids in the juvenile female pig. *Horm Behav* 15: 396-403.
174. Knott SA, Cummins LJ, Dunshea FR, Leury BJ (2008) Rams with poor feed efficiency are highly responsive to an exogenous adrenocorticotropin hormone (ACTH) challenge. *Domest Anim Endocrinol* 34: 261-268.
175. Foury A, Tribout T, Bazin C, Billon Y, Bouffaud M, et al. (2009) Estimation of genetic trends from 1977 to 2000 for stress-responsive systems in French Large White and Landrace pig populations using frozen semen. *Animal* 3: 1681-1687.
176. Hoffmann I (2010) Climate change and the characterization, breeding and conservation of animal genetic resources. *Anim Genet* 41: 32-46.
177. Mellencamp MA, Galina-Pantoja L, Gladney CD, Torremorell M (2010) Improving pig health through genomics: a view from the industry. *Dev Biol (Basel)* 132: 35-41.
178. Michel V, Peinnequin A, Alonso A, Buguet A, Cespuglio R, et al. (2007) Decreased heat tolerance is associated with hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis impairment. *Neuroscience* 147: 522-531.
179. Leenhouwers JJ, Knol EF, De Groot PN, Vos H, Van der Lende T (2002) Fetal development in the pig in relation to genetic merit for piglet survival. *J Anim Sci* 80: 1759-1770.
180. Knap PW (2008) Robustness. In: Rauw WM (Hrsg.). *Resource allocation theory applied to farm animal production*. Wallingford, UK: CABI Publishing. pp. 288-301.
181. Rauw WM (2012) Immune response from a resource allocation perspective. *Frontiers in genetics* 3: 267.

Danksagung



An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Klaus Wimmers für die Möglichkeit im Institut Genombiologie zu Promovieren und für die Übernahme der Gutachtertätigkeit.

Herrn Dr. Eduard Muráni danke ich für die umfassende Betreuung und Hilfe bei allen, im Zuge der Promotion, aufgetretenen Fragen und Problemen. Weiterhin danke ich ihm für das Vertrauen in meine Arbeit. Ich hoffe, dass wir dieses gute Arbeitsklima beibehalten und weiter erfolgreich zusammenarbeiten.

Beiden danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit, ein breites Spektrum an Methoden und Wissen zu erlernen und zu nutzen.

Für die unkomplizierte Betreuung der Promotion am Institut für Biowissenschaften und die Übernahme der Gutachtertätigkeit möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Ulrike Gimsa bedanken.

Bei Angela Garve, Hannelore Tychsen und Ronny Baaske möchte ich mich für die freundliche Atmosphäre im Labor bedanken.

Ein ganz großer Dank geht an meine Familie und Freunde für die Unterstützung während der Promotion.

Abschließend möchte ich mich bei allen Kollegen und Kolleginnen am FBN Dummerstorf, die mich während meiner Promotion begleitet haben, für die Zusammenarbeit und das positive Arbeitsklima bedanken.

Selbstständigkeitserklärung



Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt zu haben. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Rostock, 04. November 2013

Henry Reyer

Anhang



Eigenanteil an den Veröffentlichungen



Publikation I

A Substitution in the Ligand Binding Domain of the Porcine Glucocorticoid Receptor Affects Activity of the Adrenal Gland

Eduard Muráni, Henry Reyer, Siriluck Ponsuksili, Stephan Fritschka und Klaus Wimmers
Plos One 2012, 7(9), e45518.

- Mitarbeit an der Entnahme und Aufbereitung der Proben
- Beteiligung an der Planung der *in vitro* Experimente
- Durchführung der Experimente mit Ausnahme der genomweiten Assoziationsstudie
- Diskussion und Interpretation der Daten
- Erstellen einiger Abbildungen und Korrektur des Manuskripts

Publikation II

Association of N-terminal Domain Polymorphisms of the Porcine Glucocorticoid Receptor with Carcass Composition and Meat Quality Traits

Henry Reyer, Siriluck Ponsuksili, Klaus Wimmers und Eduard Muráni
Animal Genetics 2014, 45.1, 125-129.

- Mitarbeit an der Entnahme und Aufbereitung der Proben
- Beteiligung an der Planung der Experimente
- Durchführung der molekularbiologischen und statistischen Analysen
- Diskussion und Interpretation der Daten
- Verfassen des Manuskripts inklusive Literaturrecherche und Erstellen der Darstellungen

Publikation III

Transcript Variants of the Porcine Glucocorticoid Receptor Gene (*NR3C1*)

Henry Reyer, Siriluck Ponsuksili, Klaus Wimmers und Eduard Muráni

General and Comparative Endocrinology 2013, 189, 127-133.

- Mitarbeit an der Entnahme und Aufbereitung der Proben
- Beteiligung an der Planung und Durchführung der Experimente
- Diskussion und Interpretation der Daten
- Verfassen des Manuskripts inklusive Literaturrecherche sowie Erstellung von Datenbankeinträgen und Abbildungen

Publikationen und Tagungsbeiträge

1. Reyer H, Ponsuksili S, Wimmers K, Muráni E (2014) Association of N-terminal domain polymorphisms of the porcine glucocorticoid receptor with carcass composition and meat quality traits. *Anim Genet* 45.1: 125-129.
2. Reyer H, Ponsuksili S, Wimmers K, Muráni E (2013) Transcript variants of the porcine glucocorticoid receptor gene (NR3C1). *Gen Comp Endocrinol* 189: 127-133.
3. Muráni E, Ponsuksili S, Reyer H, Wittenburg D, Wimmers K (2013) Expression variation of the porcine ADRB2 has a complex genetic background. *Mol Genet Genomics*: 1-11.
4. Muráni E, Reyer H, Ponsuksili S, Fritschka S, Wimmers K (2012) A substitution in the ligand binding domain of the porcine glucocorticoid receptor affects activity of the adrenal gland. *PLoS One* 7: e45518.
5. Reyer H, Wimmers K, Muráni E (2012) A substitution in the ligand binding domain of the porcine glucocorticoid receptor has a major effect on function of the adrenal gland. *Schriftenreihe des FBN* 20: 59-62.
6. Reyer H, Muráni E (2012) Ein Stück im genetischen Puzzle. *Leibniz Nordost* 15: 6-7.
7. Westman E, Spenger C, Oberg J, Reyer H, Pahnke J, et al. (2009) In vivo ¹H-magnetic resonance spectroscopy can detect metabolic changes in APP/PS1 mice after donepezil treatment. *BMC Neurosci* 10: 33.
8. Reyer H, Kanitz E, Pöhland R, Ponsuksili S, Wimmers K, Muráni E. Ein Polymorphismus im Glucocorticoid-Rezeptor-Gen (NR3C1) als wesentliches QTN für die Aktivität der neuroendokrinen Stressachse beim Schwein. Vortrag, Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde und der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaft, 04.-05. September 2013, Göttingen, Tagungsband S. A16.

9. Reyer H. Was mendelt da im Schweinestall? – Das Schlüsselgen für Stressbewältigung. Vortrag. Rostock's Eleven, 13.-15. Juni 2012, Rostock.
10. Reyer H, Fritschka S, Ponsuksili S, Wimmers K, Muráni E. Eine natürliche Punktmutation in der Ligandenbindungsdomäne des porcinen Glucocorticoid-Rezeptors beeinflusst Cortisolausschüttung und Nebennierengewicht. Vortrag, Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde und der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaft, 06.-07. September 2011, Freising-Weihenstephan, Tagungsband S. C21.